

**UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON NOVOBIOCIN
AUF DEN TRANSEPITHELIALEN NATRIUMTRANSPORT
DER ISOLIERTEN FROSCHHAUT**

EDELTRAUD SESSELMANN

*Diss
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0072

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Klaus Thureau
Prof. Dr. med. Gerrit ten Bruggencate
Prof. Dr. med. Eckehart Gerlach

UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON NOVOBIOCIN
AUF DEN TRANSEPITHELIALEN NATRIUMTRANSPORT
DER ISOLIERTEN FROSCHHAUT

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Edeltraud Sesselmann
aus
München
1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Thureau
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. U. Welsch Prof. Dr. H. Jahrmärker
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv.-Doz. Dr. R. Rick
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	19. Juni 1985

Meiner Mutter
und zur Erinnerung an
meinen Vater

INHALT

1.	EINLEITUNG	1
2.	THEORETISCHE GRUNDLAGEN UND LITERATURÜBERSICHT	6
2.1	Prinzipien der Zellhomöostase	6
2.2	Diffusion und Permeation über die Zellmembran	10
2.3	Diffusions- und Membranpotential	11
2.4	Gleichgewichtspotential	12
2.5	Die "constant-field"-Gleichung	18
2.6	Beitrag elektrogener Pumpen zum Ruhemembranpotential	22
2.7	Aktiver Transport	24
2.8	Transepithelialer Natriumtransport	26
2.9	Treibende Kraft des aktiven Natriumtransports	31
2.10	Sättigung des Natriumtransports	32
2.11	Wirkung von Novobiocin an der Froschhaut	35
2.12	Wirkung von Novobiocin auf andere Systeme	36
3.	METHODE	38
3.1	Präparation der Haut	38
3.2	Inkubation der Haut	38
3.2.1	Kurzschlußstrommethode	38
3.2.2	Punktionskammer	40
3.2.3	Inkubationskammer	42
3.3	Registrierung der elektrischen Hautparameter	42
3.4	Herstellen und Testen der Mikroelektroden	45
3.5	Inkubationslösungen	46

3.6	Intrazelluläre Potentialbestimmungen	47
3.7	Punktionskriterien	48
3.8	Auswertung der Punktionsmeßdaten	49
3.9	Elektronenstrahlmikroanalyse	53
4.	ERGEBNISSE	55
4.1	Transepitheliale Funktionsparameter	55
4.2	Untersuchungen mit Mikroelektroden	74
5.	DISKUSSION	88
6.	ZUSAMMENFASSUNG	100
7.	LITERATURVERZEICHNIS	103
	Verzeichnis der verwendeten Symbole	131

I. EINLEITUNG

Epithelzellen, die ein meist relativ konstantes Innenmilieu von einer sich oft ändernden äußeren Umgebung trennen, sorgen durch aktive, passive und selektive Transportvorgänge für den Stoffaustausch zwischen dem Organismus und seiner Umgebung. Unter den transepithelialen Substanzbewegungen spielen Ionenbewegungen und unter ihnen vor allem der aktive Transport von Natrium eine entscheidende Rolle. Natrium ist nicht nur für die Aufrechterhaltung des extrazellulären Volumens als quantitativ ausschlaggebendes Ion wichtig, sondern eine Anzahl notwendiger Transporte, wie anderer Elektrolyte, Glucose, Aminosäuren etc., sind vom Natriumtransport abhängig.

Natrium transportierende Epithelien können auf der Grundlage ihrer elektrischen Charakteristika (Frömter & Diamond, 1972; Whittembury et al., 1973) in zwei Gruppen, sogenannte "lecke" und "dichte" Epithelien, eingeteilt werden. Die elektrischen Unterschiede erklären sich weitgehend aus den unterschiedlichen Widerständen der Verbindungskomplexe zwischen den Zellen - den sogenannten "tight junctions" (Farquhar & Palade, 1963), welche die Epithelzellen an ihrem äußeren Rand umgeben und die Zellen untereinander zusammenhalten (Claude & Goodenough, 1973; Staehelin, 1974). Daneben müssen die unterschiedlichen Eigenschaften der apikalen Membranen von lecken und dichten Epithelien berücksichtigt werden. Die unterschiedlichen elektrischen Charakteristika gehen mit wesentlichen physiologischen Besonderheiten Hand in Hand. So sind lecke Epithelien (proximaler Tubulus von Säugetieren) auf die Aufnahme von Ionen und Wasser in großem Ausmaß über sehr kleine elektrochemische und osmotische Gradienten spezialisiert, während dichte Epithelien (Froschhaut, distaler Tubulus, Harnblase) selektive Ionen- und Wasserbewegungen durchführen können, oft

unter hormonaler Kontrolle und ohne notwendige Kopplung der beiden Transportprozesse.

Das Interesse für die Transporteigenschaften von Epithelien wurde durch Ussing und Mitarbeiter erweckt, die die grundlegenden Begriffe und Techniken für die Untersuchung des transepithelialen Transport durch ihre Studien an der isolierten Froschhaut entwickelten. Ussing und Zerahn (1951) erkannten, daß die isolierte Froschhaut einen von außen in die Zellen gerichteten Natriumtransport besitzt. Seither wurde das Froschhautepithel zu zahlreichen Untersuchungen herangezogen. Koefoed-Johnsen und Ussing stellten 1958 ein Transportmodell vor, das in den Grundzügen auf die meisten aktiv transportierenden Epithelien angewendet werden kann (Abb. 1): Natrium gelangt

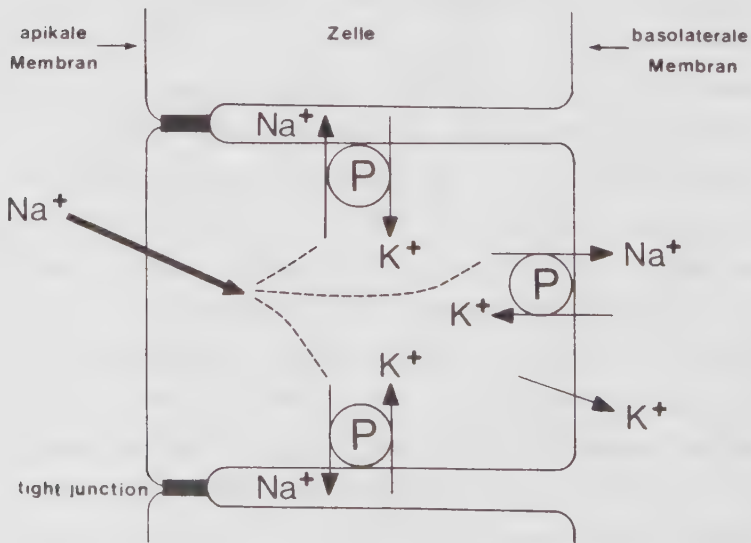


Abb. 1: Vereinfachtes Modell für den transepithelialen Natriumtransport
P = ATP verbrauchende Ionenpumpe.

über eine Natrium selektive Membran (apikale Membran) passiv in das Zytoplasma der Epithelzellen und wird über die innere Barriere (basolaterale Membran) unter Verbrauch von Stoffwechselenergie im Austausch gegen Kalium (Na^+/K^+ -ATPase) zur inneren Seite transportiert. Das einwärts-transportierte Kalium diffundiert passiv, entlang einem elektrochemischen Gradienten wieder ins Innenbad zurück. Die "tight junctions" im apikalen Membranbereich unterbinden nahezu vollständig die Natriumrückdiffusion zwischen Interzellulärraum und apikalem Extrazellulärraum. Dagegen kann Chlor, getrieben durch einen Potentialgradienten, durch die "tight junctions" diffundieren.

Da das Froschhautepithel aus mehreren Zellagen gebildet ist, bestand ein Problem darin, anatomisch das Transportkompartiment zu lokalisieren (Farquhar & Palade, 1965; Martinez-Palomo et al., 1971; Ussing et al., 1974; Thompson & Dawson, 1978). Ussing und Windhager schlugen 1964 ein Modell vor, nach dem das Epithel hinsichtlich des transepithelialen Natrium-transportes als ein funktionelles Syncytium aufgefaßt werden kann. Rick und Mitarbeiter (1978, 1980) zeigten durch die Bestimmung der intrazellulären Natriumkonzentration des Froschhautepithels mit Hilfe der Elektronenstrahl-mikroanalyse die Übereinstimmung mit einem 2-Barrieren-Konzept des transepithelialen Natriumtransportes und die Existenz eines funktionellen Syncytiums, d.h. das Transportkompartiment umfaßt alle Zellen (mit wenigen Ausnahmen) der verschiedenen Epithelschichten (Abb. 2). Der transepitheliale Transportweg für Natrium läßt sich also, wie in Abbildung 2 dargestellt, beschreiben: Natrium tritt ungehindert durch das Stratum corneum passiv über die äußere Zellmembran des Stratum granulosum in das Epithel ein, gelangt über Zwischenzellverbindungen (gap junctions, Loewen-

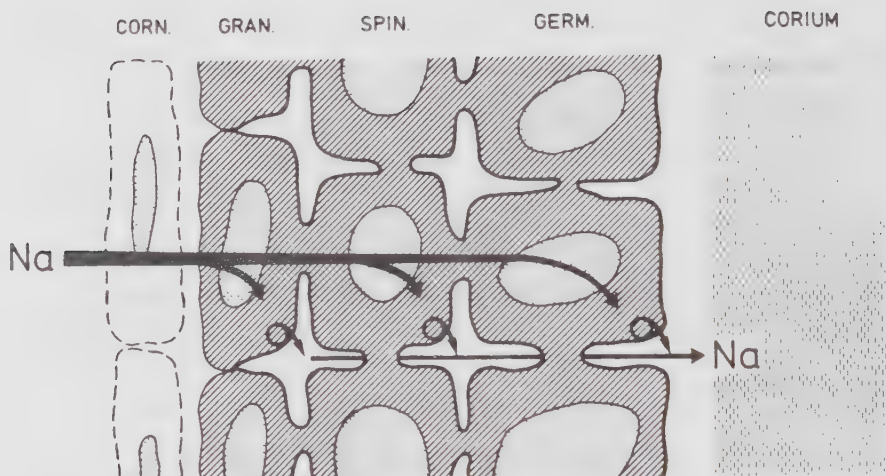


Abb. 2: Modell des transepithelialen Natriumtransportes in einem mehrschichtigen Epithel (Rick, 1981). Erläuterungen siehe Text.

stein, 1966, 1970, 1978; Rose, 1971) auch in die tieferen Epithelschichten, wird aktiv über die basolateralen Zellmembranen in die Interzellularspalten transportiert und diffundiert dann zur Innenseite ab.

In dieser Arbeit werden Untersuchungen über die Wirkung von Novobiocin auf den Natriumtransport dargestellt. Das Antibiotikum Novobiocin ruft an der isolierten Froschhaut mehr als eine Verdopplung des transepithelialen Natriumstromes (Kurzschlußstroms) hervor (Johnston & Hoshiko, 1971; Cruz & Biber, 1976) und führt zu einem starken Anwachsen der intrazellulären Natriumkonzentration (Rick et al., 1981). Diese beiden Wirkungen von

Novobiocin können durch Amilorid vollständig aufgehoben werden. Dieser Befund und die Tatsache, daß das Froschhautepithel nur bei Zugabe von Novobiocin ins Außenbad reagiert, bekräftigt die Annahme einer spezifischen Wirkung auf den Natriumeinstrom über die apikale Membran.

Mit Hilfe von Mikroelektroden wurde die Wirkung von Novobiocin auf das intrazelluläre Potential und auf das Widerstandsverhältnis der Außen- und Innenmembran untersucht. Durch die Bestimmung des intrazellulären Potentials und mit der Kenntnis der zellulären Natriumkonzentration konnte die Natriumpermeabilität (P_{Na}) der Außenmembran berechnet werden. Die Ergebnisse zeigen, daß Novobiocin zu einer Erhöhung von P_{Na} durch die Aufhebung der Transportsättigung bei hohen Konzentrationen von Natrium (Hemmung der Natrium-Selbsthemmung) führt. Außerdem konnte mit Novobiocin die treibende Kraft für den Natriumeinstrom (E_{Na}) durch zwei verschiedene Verfahren bestimmt werden.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN UND LITERATURÜBERSICHT

2.1 Prinzipien der Zellhomöostase

Das interne Milieu von Zellen ist sehr verschieden von ihrer Umgebung (Extrazellulärraum) und wird durch membrangebundene aktive und passive Transportprozesse aufrechterhalten. Zellmembranen von Epithelzellen erfüllen zudem Transportaufgaben für den Gesamtorganismus. Sie resorbieren Substrate, Salze und Wasser aus dem Außenraum und scheiden im Organismus anfallende Endprodukte wieder aus. Zwischen den Transportmechanismen zur Konstanterhaltung der internen Homöostase und den transepithelialen Transporten bestehen große Ähnlichkeiten.

Die Natur der an die Membran gebundenen Transportprozesse konnte genauer untersucht werden, als radioaktive Isotope zur Analyse der unidirektionalen transmembranalen Ionenflüsse zur Verfügung standen (Katzin, 1940). Katzin (1939) und Ussing (1949) wiesen an der isolierten Froschhaut nach, daß der Einstrom von Natrium den entgegengesetzten Ausstrom bei weitem übertrifft. Da Natrium sowohl gegen elektrische als auch gegen chemische Gradienten nettomäßig resorbiert wurde, nahm Ussing (1949) einen aktiven Transportmechanismus an. Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen aktiven und passiven Transportvorgängen bieten die von Teorell (1949) und Ussing (1950) für passive Ionentransporte abgeleitete Flußgleichungen. Während die unidirektionalen Flüsse für Chlorid und andere Anionen unter allen Bedingungen der Flußgleichung entsprachen (Ussing, 1950; Koefoed-Johnsen et al., 1952; Linderholm, 1952), wichen die Natriumflüsse von der Flußgleichung stets ab (Ussing, 1950) und konnten daher als aktiv charakterisiert werden. Die Einführung der Kurzschlußstrommethode durch Ussing und Zerahn (1951) stellt einen weiteren methodischen Fort-

schritt für die Analyse aktiver transepithelialer Ionentransporte dar (siehe 3).

Abbildung 3 stellt das Modell einer Zelle dar. Über die Plasmamembran

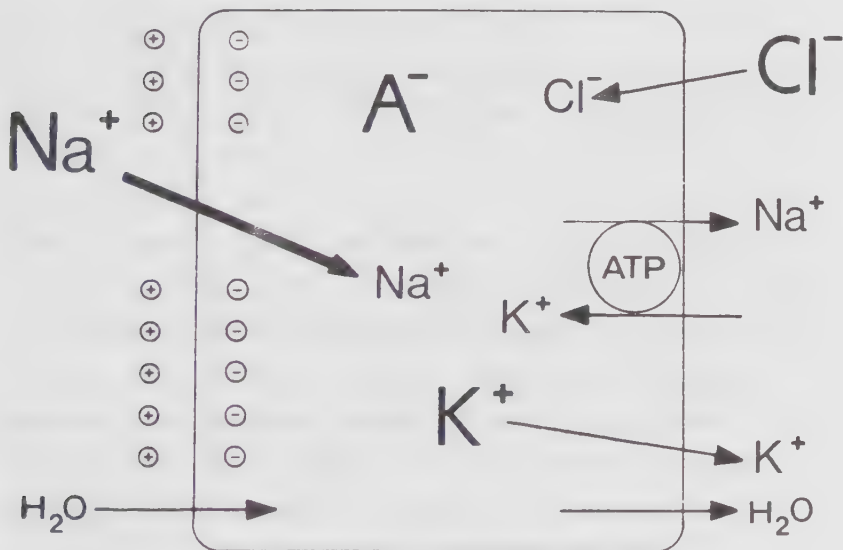


Abb. 3: Ionenbewegungen (Na^+ , K^+ , Cl^-) und elektrisches Potential über die Zellmembran. Relative Konzentrationen sind durch verschiedene Buchstaben-Größen gekennzeichnet (A^- = über die Membran impermeable Anionen).

sind die verschiedenen Ionenbewegungen und das elektrische Potential angedeutet. Die relativen Ionenkonzentrationen werden durch Größenunterschiede der Buchstaben angezeigt. Tabelle 1 gibt zusätzlich die extra- und intrazellulären Ionenkonzentrationen in mmol/kg Feuchtgewicht (FG) an.

	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Intra- zell.	10	120	36
Extra- zell.	110	25	80

Tabelle 1: Intra- und extrazelluläre Konzentrationen für Na⁺, K⁺ und Cl⁻ in mmol/kg Feuchtgewicht für die Froschhaut (Rick, 1980; Zylber et al., 1975; Nagel et al., 1981).

Ausgehend von Abb. 3 und den Werten aus Tabelle 1 lassen sich einige Prinzipien der Zellhomöostase erkennen:

- Wasser ist im osmotischen Gleichgewicht über die Zellmembran und kann diese frei passieren.
- Große organische Moleküle (Proteine) in geladenem und ungeladenem Zustand werden in der Zelle festgehalten. Bei nahezu neutralen pH-Werten ist ihre Gesamtladung negativ (A⁻). Diese osmotisch aktiven Moleküle müssen durch extrazelluläre osmotisch aktive Teilchen, die nicht in die Zelle gelangen sollen, ausbalanciert werden. Im anderen Fall wäre die Zelle nicht im osmotischen Gleichgewicht und würde schwellen. Dieses externe Teilchen ist Natrium (Na⁺), das sich in hoher Konzentration außerhalb und in niedriger in der Zelle befindet. Da die Nettoladung der intrazellulären organischen Ionen negativ ist, müssen zur Erhaltung der Elektroneutralität innerhalb der Zelle Kationen vorhanden sein; für Epithelzellen der Froschhaut ist dieses intrazelluläre Kation das Kaliumion (K⁺), das sich in der Zelle in hoher Konzentration (~ 120 mmol/kg FG) befindet, während die äußere Umgebung nur etwa 2.5 mmol/kg FG enthält.

- Zwischen dem Inneren und Äußeren der Zelle besteht eine negative Potentialdifferenz. Dieses sogenannte Membranpotential (E_M) wird in erster Linie dadurch hervorgerufen, daß das Kaliumion sein Konzentrationsgefälle zwischen dem Zellinneren und der Umgebung durch Diffusion auszugleichen versucht. Eine Auswirkung dieses negativen Membranpotentials (Innenseite negativ gegenüber der Außenseite) ist auch der teilweise Ausschluß beweglicher negativer Ionen, besonders des Chloridions (Cl^-) aus dem Zellinneren. Umgekehrt wird dadurch die Auswärtsbewegung von Kaliumionen behindert, während die Tendenz der Natriumionen, entlang ihres Konzentrationsgradienten in die Zelle zu gelangen, verstärkt wird. Zur Verhütung dieses Einwärtsstroms von Natriumionen, der das osmotische Gleichgewicht der Zelle stören würde, muß die Zelle Stoffwechselenergie (ATP) aufwenden, um damit den Natriumüberschuß aus der Zelle zu transportieren (bzw. zu "pumpen"). In den meisten Fällen ist dieser aktive Natriumauswärtstransport mit einem Kaliumeinwärtstransport verbunden, der die interne Kaliumkonzentration aufrecht erhält.

Die Aufrechterhaltung ihrer Homöostase regulieren die Zellen durch die Permeabilitäten ihrer Membranen für Wasser, Ionen und Nichtelektrolyte, durch ihre fixen organischen Anionen im Inneren und durch das Ausmaß des Iontentransports. Wie auch immer die Kombination dieser Faktoren in der Zelle verwirklicht ist, sie resultiert in einem Gleichgewicht, in welchem kein Nettotransport existiert. D.h. der Transport einer gegebenen Substanz (z.B. der Elektrolyte: Na^+ , K^+ , Cl^-) wird durch einen entsprechend großen Gegentransport ausgeglichen. Dieser Austauschtransport wird auf der einen Seite durch "passive" Flüsse (hauptsächlich passive Ionenflüsse) getragen,

hervorgerufen durch Konzentrationsgradienten, elektrische Potentialgradienten, eventuell Druck- und Temperaturunterschiede, auf der anderen Seite durch einen "aktiven" Transport von Ionen, wie Natrium und Kalium, der unter Verbrauch von Stoffwechselenergie gegen einen elektrochemischen Gradienten erfolgen kann. So scheinen die Eigenschaften des aktiven Transportmechanismus die letztlich bestimmende Größe für die Ionen- und damit Wasserverteilung in der Zelle zu sein.

2.2 Diffusion und Permeation über die Zellmembran

Permeation kann in erster Näherung als Diffusion einer Substanz durch die Wasserphase bis zur Zellmembran, Diffusion durch die Membran und Wegdiffusion von der Membran auf der anderen Seite betrachtet werden. Sie beinhaltet mehr als die reine Passage von Teilchen durch die Membran, wobei diese Passage in manchen Fällen, z.B. bei gelösten Gasen nicht der begrenzende Faktor für den Transport ist. Im einfachsten Fall werden die Teilchen die Zellwand ohne Verbrauch von metabolischer Aktivität durchqueren, unter der treibenden Kraft des Konzentrationsgefälles zwischen den beiden Kompartimenten. Die physikalische Grundlage einer derartigen Substanzbewegung ist das Fick'sche Diffusionsgesetz:

$$\frac{dN}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{\Delta c}{\Delta x} = -\frac{D}{d} A (c_i - c_o) = -P \cdot A (c_i - c_o) \quad (1)$$

Index i bzw. o stehen für Innen- bzw. Außenseite; "o" für englisch "outer");

N = Teilchenzahl; D = Diffusionskonstante (cm²/sec);

A = Diffusionsfläche; $\Delta x = d$ = Membrandicke;

$\Delta c = c_i - c_o$ = Konzentrationsunterschied zwischen Zellinnerem (c_i)

und -äußere (c_o);

$P = D/d$ = Permeabilitätskonstante (cm/sec).

Die Permeabilitätskonstante P , mit der Einheit einer Geschwindigkeit, definiert quantitativ die Leichtigkeit, mit der eine gegebene Substanz die Zellmembran durchdringen kann und ist somit eine Eigenschaft der Zellmembran.

Permeabilitätsmessungen zeigen, daß je kleiner und je lipidlöslicher die permeierenden Teilchen sind, sie umso leichter die Membran durchqueren können. Kleine Moleküle, wie Wasser und gelöste Gase, und lipidlösliche Moleküle, wie Äther, wechseln mit großer Leichtigkeit über die Membran. Bei großen Molekülen ist die Anzahl der nichtpolaren Gruppen für die Permeationsgeschwindigkeit entscheidend (Stein, 1967; Finklestein & Cass, 1968; Finklestein, 1976).

2.3. Diffusions- und Membranpotential

Elektrolyte wie Nichtelektrolyte diffundieren in freier Lösung und über Membranen. Wegen ihrer elektrischen Ladung erscheint es energetisch unwahrscheinlich, daß Elektrolyte über die Lipiddoppelschicht von Membranen diffundieren können. Ionen passieren die Membran wahrscheinlich durch polare Poren von in der Membran eingebauten Proteinen oder durch in der Membran bewegliche Ionophore.

Elektrolyte bewegen sich in freier Lösung unter dem Einfluß von elektrischen Potentialen und bauen durch Diffusion elektrische Potentiale auf.

Solche Diffusionspotentiale können spontan auftreten, wenn sich z.B. eine Ionenart schneller oder langsamer als das Gegenion bewegt. Ein Beispiel einer derartigen Diffusion tritt an der Verbindung zwischen einer Salzbrücke, gefüllt mit einer konzentrierten monovalenten Salzlösung, und einer verdünnten Lösung desselben Salzes auf. Das konzentrierte Salz diffundiert entlang seines Konzentrationsgradienten, wie im Fick'schen Gesetz beschrieben, in die verdünnte Salzlösung. Im allgemeinen wird eines der beiden Ionen (Kation oder Anion) beweglicher sein und sein Gegenion zurücklassen. Ist das schnellere Ion ein Kation, wird die Lösung, in die es diffundiert, positiv, während die zurückgelassene Lösung negativ wird. Dieses so entstandene Diffusionspotential bremsst das Kation und beschleunigt das Anion. Die Energiequelle für das Potential ist der Konzentrationsgradient; verschwindet das Konzentrationsgefälle, wird ebenso das Diffusionspotential behoben werden.

Konzentrationsgradienten von Ionen existieren auch über Zellmembranen, da keines der wichtigen Ionen (Na^+ , K^+ , Cl^-) auf beiden Seiten der Zellmembran in gleichen Konzentrationen vorkommt. Daher bauen sich über die Zellmembran Diffusionspotentiale auf.

2.4 Gleichgewichtspotentiale

Eine Membran kann im Extremfall für eine Ionenart permeabel, für das Gegenion jedoch impermeabel sein. Es resultiert dann zwar ein Diffusionspotential, jedoch wird die Nettobewegung des permeierenden Ions beendet sein, wenn die sich entwickelnde Potentialdifferenz an der Membran ein weiteres Durchqueren der Membran verhindert.

Das Membranpotential, das die Nettodiffusion eines Ions über die Membran unterbindet, wird als sein Gleichgewichtspotential (E_{Ion}) bezeichnet. Die drei für Zellen hauptsächlich interessanten Gleichgewichtspotentiale sind das für Kalium (E_K), Natrium (E_{Na}) und Chlor (E_{Cl}). Das elektrochemische Potential für ein Ion, μ' , ist gegeben durch:

$$\mu' = \mu + zFV \quad (2)$$

mit

μ = chemisches Potential; V = elektrisches Potential;

z = Valenzzahl des betreffenden Ions;

F = Faraday Konstante (96 500 Coulomb/mol).

Für die treibende Kraft für die Ionendiffusion ist der negative elektrochemische Potentialgradient

$$- \frac{d\mu'}{dx} = - \left(\frac{d\mu}{dx} + zF \frac{dV}{dx} \right) \quad (3)$$

und mit

$$\frac{d\mu}{dx} = \frac{RT}{c} \frac{dc}{dx} \quad (4)$$

ergibt sich

$$- \frac{d\mu'}{dx} = - \left(\frac{RT}{c} \frac{dc}{dx} + zF \frac{dV}{dx} \right) \quad (5)$$

$R =$ Gaskonstante ($8.31 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$);

$T =$ absolute Temperatur ($273.16 + t \text{ } ^\circ\text{C}$);

$c =$ Konzentration des Ions.

Wie bei der Diffusion von ungeladenen Substanzen ist die Geschwindigkeit der Ionen das Produkt aus der wirkenden Kraft und ihrer Beweglichkeit u' , im Fall von geladenen Teilchen, ihrer elektrischen Beweglichkeit

$$u = u' F \left(\frac{\text{cm/sec}}{\text{V/cm}} \right). \quad (6)$$

Es gilt also für die Geschwindigkeit v

$$v = - \frac{u}{F} \left(\frac{RT}{c} \frac{dc}{dx} + zF \frac{dV}{dx} \right) \quad (7)$$

Der Ionenfluß $\frac{dN}{dt}$ stellt sich als Produkt der Ionenkonzentration und der mit der Geschwindigkeit v durchquerten Diffusionsfläche A dar:

$$\frac{dN}{dt} = - \frac{u}{F} c A \left(\frac{RT}{c} \frac{dc}{dx} + zF \frac{dV}{dx} \right) \quad (8)$$

Da Ionenflüsse Ströme (I') darstellen, gilt

$$\frac{dN}{dt} = \frac{I'}{zF}$$

und mit $I = \frac{I'}{A}$ ergibt sich aus (8)

$$I = -zu \left(RT \frac{dc}{dx} + zcF \frac{dV}{dx} \right). \quad (9)$$

Gleichung 9 beschreibt die passive Bewegung einer Ionenart unter dem Einfluß eines elektrochemischen Gradienten. Von physiologischem Interesse ist das elektrische Potential über die Membran, bei dem keine Nettoionenbewegung mehr stattfindet, mit anderen Worten $I = 0$ gilt. Solange die Beweglichkeit (u) des Ions in der Membran nicht Null ist, d.h. die Membran für das Ion permeabel ist, ergibt sich

$$\frac{RT}{c} \frac{dc}{dx} = -zF \frac{dV}{dx} \quad (10)$$

Gleichung 10 bedeutet, daß die Kräfte, hervorgerufen durch einen chemischen und einen elektrischen Potentialgradienten, entgegengesetzt gleich groß sind und in diesem Fall auf die Ionen keine Nettokraft wirkt. Durch Integration von 10 kann das Gleichgewichtspotential (E_{Ion}) berechnet werden.

$$-\frac{RT}{zF} \int_0^i \frac{dc}{c} = \int_0^i dV \quad (11)$$

und

$$E_{\text{Ion}} = V_i - V_o = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{c_i}{c_o} \quad (12)$$

Durch Umwandlung des natürlichen Logarithmus in den allgemeinen und Einsetzen der Konstanten R , T und F ergibt sich bei 20°C:

$$E_{\text{Ion}} = -58 \text{ mV} \log \frac{c_i}{c_o}, \quad (z = 1) \quad (13)$$

Gleichung 13 ist die bekannte Nernst'sche Gleichung. Angewendet auf biologische Membranen ergibt sich dieses Potential aus der Potentialdif-

ferenz zwischen Zellinnerem und der äußeren Umgebung. Daraus folgt für die Hauptionen Kalium, Natrium und Chlor:

$$E_K = - 58 \text{ mV} \log \frac{(K^+)_i}{(K^+)_o} \quad (14a)$$

$$E'_{Na} = - 58 \text{ mV} \log \frac{(Na^+)_i}{(Na^+)_o} \quad (14b)$$

$$E_{Cl} = - 58 \text{ mV} \log \frac{(Cl^-)_o}{(Cl^-)_i} \quad (14c)$$

Wenn das Membranpotential U_o einer Zelle identisch dem Gleichgewichtspotential eines Ions ist, so findet für dieses Ion keine Nettobewegung in die oder aus der Zelle statt. Jedes andere permeable Ion, das nicht im Gleichgewicht mit diesem Membranpotential (Ruhemembranpotential U_o) steht, wird in Richtung seines Gleichgewichts wandern. Im allgemeinen haben alle Ionen unterschiedliche Gleichgewichtspotentiale, so daß das Membranpotential einer "ruhenden" Zelle (Ruhemembranpotential) nur relativ nahe am Gleichgewichtspotential eines oder mehrerer Ionen sein kann. Aus Beispielen von Gleichgewichtspotentialen und Membranpotentialen einer Reihe von Zellen (Tabelle 2) geht hervor, daß bei keiner dieser Zellen Natrium nahe am Gleichgewicht ist.

Zahlreiche Beispiele und Untersuchungen über die Abhängigkeit des Membranpotentials von der äußeren (und inneren) Kaliumkonzentration am Tintenfischaxon (Curtis & Cole, 1942; Baker et al., 1962), am Froschmuskel (Ling & Gerard, 1949; Nastuk & Hodgkin, 1950; Adrian & Slayman, 1956; Conway, 1957; Adrian & Slayman, 1966), an Gliazellen (Hodgkin & Horowics, 1959; Kuffler & Nicholls, 1966) und Froschhautepithelzellen (Helman &

	Tintenfisch- axon	Froschmuskel- zelle	Froschepithel- zelle (*)	Erythrozyt (Mensch)
Membran- potential U_0 (mV)	- 73	- 92	- 80	- 6 bis - 10
E'_{Na} (mV)	45	53	60	55
E_K (mV)	- 73	- 101	- 90	- 86
E_{Cl} (mV)	- 44	- 92	- 30	- 9

Tabelle 2: Gleichgewichtspotentiale (E'_{Na} , E_K , E_{Cl}) und Membranpotential verschiedener Zellarten (DeVoe & Maloney, 1980) (*) abgeschätzt aus Nagel et al., 1981).

Fisher, 1977b; Nagel, 1977, 1980) zeigen, daß das Ruhemembranpotential in erster Näherung ein E_K -Potential ist und Chlor sich in manchen Fällen passiv verteilt, um ins Gleichgewicht zu kommen (Donnan, 1924). Die Epidermis einiger Froschspezies weist jedoch eine aktive Chloridresorption auf (Zadunaisky et al., 1963; Martin & Curran, 1966; Garcia-Romeu et al., 1969; Erlij, 1971; Kristensen, 1972). Das Membranpotential läßt sich daher scheinbar leicht auf der Basis des Ionengleichgewichts von Kalium erklären, jedoch sind andere Ionen, besonders Natrium und Chlor, auch daran beteiligt. Effekte der Konzentrationsänderungen von Natrium sind zum Beispiel

dann signifikant bemerkbar, wenn das Membranpotential bei physiologischen Werten von $(K^+)_{\text{O}}$ vom Kaliumgleichgewichtspotential abweicht (Slayman & Slayman, 1962; Kuffler & Nicholls, 1966; Freeman, 1971). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit auch Ionen, die weit vom Gleichgewicht entfernt sind, wie Natrium, für die Beschreibung des Membranpotentials zu berücksichtigen. Goldman entwickelte 1943 daher für passive Ionenbewegungen die "constant-field"-Gleichung.

2.5 Die "constant-field"-Gleichung

Der Zweck der "constant-field"- oder Goldman-Gleichung ist, voraussagen zu können, wie die Verteilung einer Anzahl permeierender Ionen, die sich nicht im Gleichgewicht befinden, das Membranpotential U_0 festlegen werden. Es wird also ein Membranpotential, aufgebaut durch passive Ionenströme, theoretisch bestimmt. Die grundlegende Annahme, die bei der Lösung der Diffusionsgleichung gemacht wurde, ist, daß das elektrische Feld innerhalb der Membran konstant ist (constant-field). Die Herleitung der "constant-field"-Gleichung folgt der von Hodgkin und Katz (1945). Für ein konstantes elektrisches Feld über die Membran gilt

$$\frac{dU_0}{dx} = \frac{U_0}{d} \quad (15)$$

d = Membrandicke; U_0 = Membranpotential.

Daraus ergibt sich aus Gleichung 9

$$I = - \sum_i z_i u_i \left(RT \frac{dc_i}{dx} + z_i c_i F \frac{U_0}{d} \right), \quad (16)$$

und durch Umordnen des Ausdrucks

$$dx = -uRT \frac{dc}{I + (uU_0 F c/d)} \quad (17)$$

mit $z = 1$ für univalente Ionen.

Mit Hilfe der Substitutionen

$$y = I + \frac{uU_0 F c}{d} \quad (18a)$$

$$\text{und } dc = \frac{dy}{(uU_0 F/d)} \quad (18b)$$

läßt sich 17 integrieren:

$$\int_0^d dx = -uRT \left(\frac{uU_0 F}{d} \right)^{-1} \int_{I + \frac{uFU_0 c_0}{d}}^{I + \frac{uFU_0 c_i}{d}} \frac{1}{y} dy \quad (19)$$

Das Resultat der Integration

$$d = -\frac{dRT}{U_0 F} \left(\ln \left(I + \frac{uU_0 F c_i}{d} \right) - \ln \left(I + \frac{uU_0 F c_0}{d} \right) \right) \quad (20)$$

kann mit Hilfe der Exponentialfunktion nach I aufgelöst werden:

$$I = \frac{uU_0 F}{d} \left(\frac{c_0 \cdot \exp \left(-\frac{U_0 F}{RT} \right) - c_i}{\exp \left(-\frac{U_0 F}{RT} \right) - 1} \right) \quad (21)$$

Über die Diffusionskonstante $D = uRT \cdot F^{-1}$ für ein Ion findet die Permeabilitätskonstante $P = D \cdot d^{-1} = uRT(d \cdot F)^{-1}$ Eingang in die Gleichung 21, so daß weiter gilt

$$I = \frac{F^2 U_0}{RT} \cdot P \cdot \frac{c_o \cdot \exp\left(-\frac{U_0 F}{RT}\right) - c_i}{\exp\left(-\frac{U_0 F}{RT}\right) - 1} \quad (22)$$

Gleichung 22 zeigt die allgemeine "constant-field" Beziehung für passive Ionenströme über eine Membran unter dem Einfluß von Konzentrations- und Potentialgradienten. Gleichung 23 und 24 liefern diese Beziehung für Kationen bzw. Anionen.

$$I_{\text{Kation}} = \frac{F^2 U_0}{RT} \cdot P_{\text{Kation}} \cdot \frac{(c_{\text{Kation}})_o \exp\left(-\frac{U_0 F}{RT}\right) - (c_{\text{Kation}})_i}{\exp\left(-\frac{U_0 F}{RT}\right) - 1} \quad (23)$$

$$I_{\text{Anion}} = \frac{F^2 U_0}{RT} \cdot P_{\text{Anion}} \cdot \frac{(c_{\text{Anion}})_i \exp\left(-\frac{U_0 F}{RT}\right) - (c_{\text{Anion}})_o}{\exp\left(-\frac{U_0 F}{RT}\right) - 1} \quad (24)$$

Von Interesse ist nun das Potential, das dann resultiert, wenn die gleiche Anzahl von Anionen und Kationen über die Membran diffundiert, so daß sich ihre Ladungen neutralisieren und daher kein Nettostrom fließt. Unter dieser Bedingung ist das Membranpotential konstant. Angenommen die Ströme werden durch Natrium-, Kalium- und Chloridionen getragen, dann folgt unter der oberen Bedingung

$$I_{\text{Netto}} = I_{\text{Na}} + I_{\text{K}} + I_{\text{Cl}} = 0 \quad (25)$$

und mit den Gleichungen 23, 24

$$\begin{aligned}
 I_{\text{Netto}} &= \frac{F^2 U_0}{RT} \frac{1}{\exp(-\frac{U_0 F}{RT}) - 1} \cdot \left[P_K ((K^+)_o \exp(-\frac{U_0 F}{RT}) - (K^+)_i) + \right. \\
 &\quad + P_{Na} ((Na^+)_o \exp(-\frac{U_0 F}{RT}) - (Na^+)_i) + \\
 &\quad \left. + P_{Cl} ((Cl^-)_i \exp(-\frac{U_0 F}{RT}) - (Cl^-)_o) \right] = \\
 &= 0 \quad (26)
 \end{aligned}$$

Daraus ergibt sich, daß

$$\begin{aligned}
 \exp(-\frac{U_0 F}{RT}) \cdot (P_K (K^+)_o + P_{Na} (Na^+)_o + P_{Cl} (Cl^-)_i) - \\
 - P_K (K^+)_i + P_{Na} (Na^+)_i + P_{Cl} (Cl^-)_o = 0 \quad (27)
 \end{aligned}$$

und damit

$$\exp(-\frac{U_0 F}{RT}) = \frac{P_K (K^+)_i + P_{Na} (Na^+)_i + P_{Cl} (Cl^-)_o}{P_K (K^+)_o + P_{Na} (Na^+)_o + P_{Cl} (Cl^-)_i} \quad (28)$$

Logarithmieren (Übergang zum dekadischen Logarithmus führt zum Faktor 2.303) und Auflösen nach U_0 liefert dann die allgemein bekannte Form der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung ("constant-field"):

$$U_0 = -2.303 \frac{RT}{F} \log \frac{P_K (K^+)_i + P_{Na} (Na^+)_i + P_{Cl} (Cl^-)_o}{P_K (K^+)_o + P_{Na} (Na^+)_o + P_{Cl} (Cl^-)_i} \quad (29)$$

Diese Gleichung wurde z.B. auf Membranpotentiale der Tintenfischaxone (Hodgkin & Katz, 1945) und Froschmuskel (Hodgkin & Horowicz, 1959) angewendet. Einige Vereinfachungen der Gleichung sind möglich, so z.B. wenn sich Chlorid wie im Froschmuskel passiv dem Potential entsprechend verteilt, d.h. $E_{Cl} \approx U_0$ und damit die Chloridterme aus der Gleichung wegfallen. Ebenso leicht kann gesehen werden, daß bei hohen extrazellulären Kaliumkonzentrationen der Kaliumterm überwiegt und sich die Gleichung zur Nernst Beziehung reduziert ($P_K \gg P_{Na}$, $P_K \gg P_{Cl}$)

$$U_0 = - 2.303 \frac{RT}{F} \log \frac{(K)_i}{(K)_o} . \quad (30)$$

2.6 Beitrag elektrogener Pumpen zum Ruhemembranpotential

Abb. 4 (nach Marmor & Gorman, 1970) zeigt die Anwendung der Goldman-Gleichung auf das Ruhepotential des Schneckenneurons (Abb. 4A). Bei hohen Außenkonzentrationen von Kalium ist das Potential dieses Neurons tatsächlich durch das Nernstpotential E_K beschrieben. Bei niedrigen Konzentrationen kann das Potential weder durch die Nernst-Gleichung noch durch die "constant-field"-Beziehung angegeben werden. Abb. 4B macht deutlich, daß durch Temperaturerniedrigung das auftretende Ruhepotential mit der "constant-field"-Gleichung richtig bestimmt wird. Dieser Temperatureffekt weist auf die Tätigkeit elektrogener Natriumpumpen hin. Dabei liegt das Membranpotential mit aktiver Pumpe zwischen E_K nach Nernst und dem nach der Goldman-Gleichung erwarteten Wert.

Derartige elektrogene Pumpen schaffen mehr Natrium aus der Zelle als Kalium hinein, etwa im Pumpverhältnis 3 : 2 (Thomas, 1972a,b, Garay & Garrahan, 1973; Glynn & Karlish, 1975). Der Pumpenbeitrag zum Ruhe-

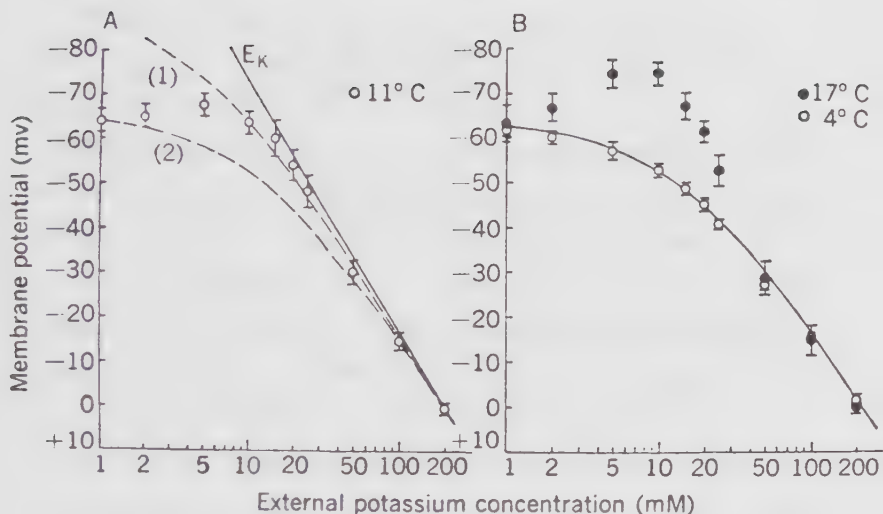


Abb. 4: Abhängigkeit des Ruhemembranpotentials von $(K^+)_{\text{O}}$ bei Schnecken-neuronen. A: Die gemessenen Ruhemembranpotentiale (1) bei 11° C sind weder dem Kaliumgleichgewichtspotential E_K , mit Ausnahme hoher Außenkonzentrationen von Kalium $(K^+)_{\text{O}}$, noch der "constant-field"-Beziehung, ausgenommen zweier Werte (2), angepaßt. B: Bei einer Temperatur von 4° C (offene Kreise) werden die Meßwerte durch die constant-field"-Gleichung - mit $P_{\text{Na}}/P_K = 0.033$; $(K)_i = 235$ mM - beschrieben. Dies gilt aber nicht bei 17° C (Nach: Marmor und Gorman, 1970).

membranpotential kann in einer der "constant-field"-Beziehung ähnlichen Gleichung beschrieben werden. Korrigiert man die Goldman-Gleichung für Natrium und Kalium in der Hinsicht, daß der Pumpenstrom durch ein Ungleichgewicht der passiven Flüsse ausgeglichen wird, ist weiterhin der Nettofluß identisch Null. Für jedes Verhältnis r von auswärtsgepumpten

Natriumionen zu einwärtsgeschafften Kaliumionen läßt sich das Membranpotential dann folgendermaßen voraussagen:

$$U_o = - 2,303 \frac{RT}{F} \log \frac{r \cdot P_K(K^+)_i + P_{Na}(Na^+)_i}{r \cdot P_K(K^+)_o + P_{Na}(Na^+)_o} \quad (31)$$

Für $r = 1$ (neutrale Pumpe) geht Gleichung 31 in die Goldman-Gleichung 29 über ($P_{Cl} = 0$). Auf der anderen Seite gilt für $r \rightarrow \infty$, d.h. wenn nur Natrium gepumpt wird, daß das Ruhemembranpotential sich E_K annähert. Für ein 3 : 2 Verhältnis von Natrium- zu Kaliumionen ist der Pumpbeitrag im Gleichgewicht nicht größer als -10 mV und kann daher im allgemeinen vernachlässigt werden (Adrian & Slayman, 1966; Thomas, 1972a). In Zellen, die aus ihrer Gleichgewichtslage z.B. durch intrazelluläre Natriuminjektionen oder Natriumansammlung und Kaliumverlust bei tiefen Temperaturen gebracht worden sind, kann jedoch das Membranpotential durch die Pumpaktivität vorübergehend bei weitem die Werte übersteigen, die durch Gleichung 31 vorausgesagt werden.

2.7 Aktiver Transport

Der aktive Transport einer Zelle definiert die Bewegung von Teilchen, die direkt durch energieliefernde metabolische Reaktionen getrieben wird und daher gegen einen chemischen oder, für geladene Teilchen, elektrochemischen Gradienten ablaufen kann.

Berechnungen des elektrochemischen Potentialgradienten für Natrium über diese Zellmembran schließen eine Nettobewegung von Natrium aus der Zelle durch einen passiven Prozeß aus und führen zu der Forderung, daß Energie für die Natriumauswärtsbewegung aufgewendet werden muß. Dieser Trans-

portschritt ist bei Epithelien (Froschhaut, Krötenblase) fest mit der $\text{Na}^+ \text{--} \text{K}^+$ -aktivierten Mg^{2+} -abhängigen ATPase ($\text{Na}^+ \text{--} \text{K}^+$ -ATPase) verknüpft, die zuerst von Skou (1965) isoliert wurde. Die Beobachtungen, daß z.B. Harnblasenepithelzellen von Amphibien dieses Enzym enthalten (Bonting & Caravaggio, 1963; Bonting & Canady, 1964; Asano et al., 1970; Cortas & Walser, 1971) und daß sowohl der transepitheliale Transport als auch das Enzym durch Herzglycoside wie Ouabain gehemmt werden können (Bonting & Caravaggio, 1963; Bonting & Canady, 1964; Asano et al., 1970; Cortas & Walser, 1971; Macknight et al., 1975) bekräftigen diese Erkenntnis. Darüber hinaus konnte an Amphibienepithelien der Bindungsort von Ouabain mit Hilfe von (^3H) Ouabain an der basolateralen Membran lokalisiert werden (Mills & Ernst, 1975).

Die Abschätzung der Stöchiometrie des Natrium-Kaliumaustausches gründet in Studien vieler verschiedener Zelltypen (Garrahan & Glynn, 1967). Durch Messungen der Kaliumflüsse an der Innenmembran konnte keine Korrelation zwischen Kaliumaufnahme und Natriumauswärtstransport gefunden werden (Essig & Leaf, 1963; Curran & Cereijido, 1965; Giebisch et al., 1973; Candia & Zadunaisky, 1977). Das Originalmodell von Koefoed-Johnsen und Ussing (1958) legte eine 1 : 1 Kopplung von Natrium- und Kaliumbewegung über die basolaterale Membran zugrunde und beschrieb die transepitheliale Potentialdifferenz als algebraische Summe eines Natriumdifusionspotentials an der apikalen Membran und eines Kaliumdifusionspotentials an der basolateralen Membran. Untersuchungen von Post und Jolly (1957) ergaben, daß an menschlichen Erythrocyten die Natrium-Kalium-Kopplung 3 : 2 beträgt, wie auch bei einer Anzahl anderer Zellen (Übersicht: Thomas, 1972a). So wurden außer an Erythrocyten (Garay & Garrahan, 1973; Glynn & Karlsh,

1975) bei zahlreichen Epithelzellen ein elektrogener Natriumtransport beobachtet: Necturus Harnblase (Frömter & Gebler, 1977; Higgins et al., 1977), Froschhaut (Nielsen, 1979; Nagel, 1978a, 1980), Dudodenum und Jujenum von Säugetieren (Okada et al., 1977), Ileum (Rose & Schultz, 1971; Frizzell & Schultz, 1972; Nellans & Schultz, 1976; Okada et al., 1977; Rose et al., 1977), Dickdarm (Schultz et al., 1977a,b), Gallenblase (Rose et al., 1973; Gelarden & Rose, 1974), Renaler Tubulus (Boulpaep, 1976, 1977).

Die Annahme, daß für den gekoppelten unsymmetrischen Austausch von Natrium- und Kaliumionen eine unveränderbare Stöchiometrie vorliegt, ist möglicherweise eine Vereinfachung. Zwar funktioniert die Natrium-Kalium-Pumpe als elektrogene Pumpe, wobei mehr Natrium als Kalium transportiert wird, aber die Transportrate kann variieren (Mullins & Brinley, 1969). So scheint die Stöchiometrie bei einer niedrigen intrazellulären Natriumkonzentration kleiner als 3 : 2, im umgekehrten Fall größer als 3 : 2 (z.B. 4 : 1) zu sein.

2.8 Transepithelialer Natriumtransport

Epithelzellen zeigen (wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt) neben einer strukturellen Polarität eine biochemische Asymmetrie, da nur die basolaterale Membran über Na^+/K^+ -Pumpen verfügt (Mills, 1975; Mills et al., 1977; Ernst & Mills, 1977). Die Polarisierung der Epithelzelle, die zu einem gerichteten transepithelialen Transport führt, beruht auf den besonderen Eigenschaften der Außenmembran, ihrer hohen Natriumleitfähigkeit (Koefoed-Johnsen-Ussing-Konzept). Die Innenmembran entspricht in ihren

Eigenschaften den Zellmembranen der meisten Körperzellen: hohe Kalium- und Chloridpermeabilität, niedrige Natriumpermeabilität (Aceves & Erlj, 1971; Cereijido & Rotunno, 1967; Dörge & Nagel, 1970; Nagel & Dörge, 1971) und Natrium-Kaliumaustauschpumpen (Aceves, 1977).

Zusätzlich sind die nebeneinanderliegenden Epithelzellen durch Dichtleisten (tight junctions) untereinander verbunden. Dabei muß aber zwischen sog. "dichten" Epithelien wie z.B. Froschhaut und Krötenharnblase, und "lecken" Epithelien wie Dünndarm, Gallenblase oder proximaler Tubulus unterschieden werden. Dichte Epithelien zeichnen sich durch hohe elektrische Widerstände, hohe Potentiale und dadurch bedingte niedrige Transportraten aus, während lecke Epithelien hohe Transportraten, niedrige Potentiale und niedrige elektrische Widerstände besitzen. Diese hohe Leitfähigkeit der lecken Epithelien wird durch einen zweiten, parazellulären Transportweg getragen (Diamond, 1964; Hoshi & Sakai, 1967; Frizzell & Schultz, 1972; Frömter, 1972). In dichten Epithelien ist dieser parazelluläre "shunt" oft zu vernachlässigen, kann aber durch Erhöhung der osmotischen Konzentration im Außenbad stark anwachsen. (Ussing & Windhager, 1964, Lindley & Hoshiko, 1964; Mandel & Curran, 1972a,b, Erlj & Martínez-Palomo, 1972, 1973; Urakabe et al., 1970).

Der Natriumeinstrom über die äußere Membran an Amphibienepithelien (Froschhaut, Krötenhaut, Krötenharnblase) ist im Gegensatz zu lecken Epithelien mit nur einem Transportmechanismus vollständig beschreibbar. Dieser elektrogene Natriumeinstrom ist von anderen Teilchenbewegungen unabhängig und durch das Diuretikum Amilorid vollständig hemmbar (Eigler et al., 1967; Dörge & Nagel, 1970; Biber et al., 1966; Biber & Curran, 1970; Biber 1970; Biber et al., 1972b; Rotunno et al., 1970; Erlj & Smith, 1971, 1973; Rick et al., 1975; Erlj, 1976). Eine stimulierende Wirkung auf den Natriumeinstrom zeigen u.a. das antidiuretische Hormon Vasopressin

(Curran et al., 1963; Cereijido & Rotunno, 1971; Handler et al., 1972; Biber & Cruz, 1973; Mandel, 1975, 1978; Nagel, 1978b; Els & Helman, 1981; Rick et al., 1984), Atropin (Kirschner, 1955), BIG (Benzimidazolyl guanidine) (Garcia-Romeu, 1974; Zeiske & Lindemann, 1974; Lindemann, 1976; Li & Lindemann, 1983a) und das Antibiotikum Novobiocin (Johnston & Hoshiko, 1971; Cruz & Biber, 1976).

Da der Natriumeinstrom unter vielen Bedingungen, Amilorid, Strophantin-G, Kälte und niedriger Natriumkonzentrationen, weitgehend dem transepithelialen Nettotransport entspricht, kann er als ein entscheidender, größenbestimmender Transportschritt aufgefaßt werden. (Rick et al., 1975; Lewis et al., 1976; Graf & Giebisch, 1979; Cox & Helman, 1983).

Intrazelluläre Potentialableitungen an der Froschhaut ergaben ursprünglich unter offenen Bedingungen ein positives (etwa + 40 mV, Zelle gegenüber Außenbad) und unter kurzgeschlossenen Bedingungen ein geringfügig negatives Zellpotential (etwa - 20 mV) (Hoshiko & Engbaek, 1956; Engbaek & Hoshiko, 1957; Ussing & Windhager, 1964; Whittembury, 1964; Cereijido & Curran, 1965; Biber & Curran, 1970; Hviid-Larsen, 1973). In der letzten Zeit wurden dagegen unter kurzgeschlossener Versuchsbedingung eindeutig negative Werte zwischen - 70 mV und - 90 mV gemessen (Nagel, 1976a; Helman & Fisher, 1977b; Fisher et al., 1980). Selbst unter offenen Bedingungen werden deutlich negative Potentialwerte bestimmt, so daß das Potential über die Außenmembran sich eher als ein Teilpotential des Innenmembranpotentials verstehen läßt (Schultz, 1972; Nagel, 1977; Helman & Fisher, 1977a,b; Schultz et al., 1977b).

Der Verteilungsraum für Natrium zwischen äußerer und innerer Membran wird allgemein als Transportkompartiment (Schoffeniels, 1957) bezeichnet. Bei Annahme eines transzellulären Transportweges entspricht das Transportkompartiment dem Intrazellulärraum der am Transport beteiligten Zellen. Da das Froschhautepithel, wie die meisten Epithelien, aus unterschiedlichen Zelltypen und außerdem aus mehreren Zellagen aufgebaut ist, sind verschiedene Lokalisationen des Transportkompartiments denkbar. Koefoed-Johnsen und Ussing (1958) waren der Ansicht, daß nur die innerste Epithelschicht (Stratum germinativum) am Transport beteiligt ist, wobei sie aber beim histologischen Aufbau des Epithels (Farquhar & Palade, 1965; Carasso et al., 1971) nur zwischen Strata cornea und Stratum germinativum unterschieden. Später wurde von Ussing und Windhager (1964) angenommen, daß alle Epithelschichten, mit Ausnahme der äußeren Hornschicht, ein gemeinsames Transportkompartiment bilden. Ein ähnliches "syncytiales" Transportmodell, wobei Natrium über die äußeren Zellmembranen des Stratum granulosum in das Epithel eindringt und über Zwischenzellverbindungen in alle anderen Zellen gelangt, von denen es über die basolaterale Membran in die Interzellularspalten transportiert wird, wurde auch von Farquhar und Palade (1965) vorgeschlagen. Im Gegensatz dazu wurde etwas später von Voûte und Ussing (1968) die Auffassung vertreten, daß nur die unmittelbar unter der Hornschicht gelegene Zellschicht, das Stratum granulosum, in den Transportschritt eingeschaltet ist. Intrazelluläre Potentialmessungen mit Mikroelektroden (Ussing und Windhager, 1964), der Zeitverlauf des transepithelialen Potentials bei schnellen Änderungen der Natriumkonzentration im Außenbad (Kidder et al., 1964; Fuchs et al., 1972), elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Verteilung einer extrazellulären Markersubstanz (Martínez-Palomo et al., 1971) und Analysen der Elektrolytverteilung mit Hilfe der Elektronenstrahlmikrosonde (Dörge et al., 1974; Rick et al., 1978)

zeigten, daß die äußere Transportbarriere den Außenmembranen der Stratum granulosum Zellen entspricht. Da zudem der Natriumeintritt in die Interzellularspalten in Höhe des Stratum granulosum durch "tight junctions" verhindert ist (Farquhar & Palade, 1965; Martinez-Palomo et al., 1971), kann die Beteiligung dieser Zellschicht zumindest vorausgesetzt werden.

Rick und Mitarbeiter untersuchten mit Hilfe der elektronenstrahlmikroanalyse die Lokalisation des Natriumtransportkompartiments im Froschhautepithel (Rick, 1978, 1980; Rick et al., 1981). Sie zeigten, daß sich das Natrium in allen Zellagen wie Transport-Natrium verhält. Insbesondere die Tatsache, daß auch die tieferen Zellagen ihr Natrium mit der Außenseite austauschen, obwohl sie anatomisch nicht mit dem Außenbad in Verbindung stehen, weist auf Zwischenzellverbindungen mit hoher Natriumleitfähigkeit hin (Rose, 1971; Moreno et al., 1973; Simpson et al., 1976). Die gute elektrische Kopplung zwischen den verschiedenen Epithelschichten konnte auch durch intrazelluläre Messungen mit Mikroelektroden gezeigt werden (Nagel, 1976b; Helman & Fisher, 1977b).

Das Epithel kann also im Hinblick auf den transepithelialen Natriumtransport als ein funktionelles Syncytium aufgefaßt werden: Natrium tritt durch das Stratum corneum passiv über die äußere Zellmembran des Stratum granulosum in das Epithel ein, damit über die Zwischenzellverbindungen in die tieferen Epithellagen und wird aktiv durch die Na^+/K^+ -Pumpen der basolateralen Zellmembranen in die Interzellularspalten und somit zur Innenseite transportiert.

2.9 Treibende Kraft des aktiven Natriumtransports

Der Begriff der treibenden Kraft E_{Na} wurde von Ussing und Zerahn (1951) eingeführt und von Ussing (1955) benutzt, um die elektromotorische Kraft des Natriumtransports bei Studien mit der isolierten Froschhaut beschreiben zu können. Ussing (1955) versuchte, E_{Na} über die Flußgleichungen zu bestimmen. Diese Gleichungen können aber nur dann als Maß für E_{Na} verwendet werden, wenn das Flußverhältnis in allen Kanälen, durch die die Teilchen treten können, gleich ist, wenn keine Interaktion der Isotope auftritt und wenn keine Austauschdiffusion vorliegt, was weder für die Froschhaut noch für die Krötenblase gezeigt werden konnte. Civan, Kedem und Leaf (1966) fanden über die Effekte von Vasopressin an der Krötenblase Werte für E_{Na} von mindestens 170 mV. Civan (1970) untersuchte E_{Na} in Studien der Strom-Spannungsbeziehung an der Krötenblase und kam dabei auf Werte von 172 bis 184 mV. Yonath und Civan (1971) verwendeten die Annahme, daß Vasopressin nur auf die apikale Membran der Epithelzellen wirkt, um E_{Na} zu bestimmen. Die derart berechneten Werte liegen zwischen 74 und 186 mV. Sie beobachteten keine Reduzierung von E_{Na} , wenn der Natriumtransport durch Amilorid gehemmt wurde, wohingegen bei einer ähnlich großen Transporthemmung durch Ouabain E_{Na} stark vermindert wurde. Während Vasopressin den transepithelialen Natriumtransport durch Verkleinerung des Widerstandes für die Natriumbewegung über den aktiven Transportweg stimuliert, hemmt Amilorid den Transport von Natrium durch Vergrößerung dieses Widerstandes. Bei hohen Amiloridkonzentrationen (0.1 - 1 mM) ist der aktive Natriumtransport vollständig blockiert und die noch übrige Leitfähigkeit beruht auf parallelgeschalteten, passiven, lecken Transportwegen, den parazellulären "shunts". So kann aus dem Kurzschlußstrom (I_{sc}) und der aktiven transzellulären Leitfähigkeit (g_{tc}) E_{Na} direkt be-

stimmt werden:

$$E_{Na} = I_{sc} \cdot (g_{tc})^{-1} \quad (32)$$

Hong und Essig (1976) erhielten auf diese Weise E_{Na} -Werte, die größer waren als die mit Vasopressin gemessenen Werte.

In der Natur des Transportsystems liegt, daß bei Zunahme des Natriumstroms (I_{sc}) die Arbeit, die erforderlich ist, um jedes Natriumion zu transportieren, vermindert wird. Im 2-Barrieren Modell des transepithelialen Natriumtransports begrenzt die niedrige Ionenleitfähigkeit der apikalen Plasmamembran die Natriumeinstromrate in die transportierenden Zellen und stellt so den begrenzenden Transportschritt dar. Eine hohe Natriumtransportrate erfordert eine relativ hohe apikale Leitfähigkeit, so daß mehr Natrium in die Zelle gelangt. Dies führt zum Anwachsen der Natriumkonzentration im Intrazellulärraum. So reduziert sich der chemische Gradient von Natrium zwischen dem Zellinneren und der serosalen Seite. Da das elektrische Potential nicht proportional dazu zunimmt, erfolgt eine Abnahme des elektrochemischen Potentials, gegen welches Natrium transportiert wird, und das berechnete E_{Na} wird mit zunehmendem I_{sc} abfallen.

2.10 Sättigung des Natriumtransports

Die Sättigung des unidirektionalen transepithelialen Natriumeinstroms mit zunehmender äußerer Natriumaktivität $(Na^+)_{\circ}$ wurde schon von Ussing 1949 beschrieben. Zu dieser Zeit war noch nicht klar, ob die Sättigung durch einen Prozeß an der Außenmembran oder durch Akkumulation von Natrium in der Zelle hervorgerufen wird. Die Analyse von Cereijido et al. (1964) zeigte, daß der Kurzschlußstrom ebenso wie der unidirektionale Natriumein-

strom ein Sättigungsverhalten besitzt. Dieses Phänomen wurde als eine Abnahme der Natriumpermeabilität der apikalen Membran mit zunehmender Außenkonzentration $(\text{Na}^+)_o$ beschrieben.

Der Transport durch die Natrium selektive Membran wurde von Biber und Curran (1970) und Rotunno et al. (1970) durch die Bestimmung des unidirektionalen Natriumflusses vom Außenbad in das Transportkompartiment mit Hilfe von Tracern untersucht. Das Ergebnis dieser Tracer-Aufnahmeexperimente war eine Bestätigung der früheren Erkenntnisse. Biber und Curran (1970) formulierten die Abhängigkeit der sättigbaren Komponente des unidirektionalen Natriumeinstroms j_{12} von $(\text{Na}^+)_o$ durch eine Gleichung nach dem Michaelis-Menten Typ:

$$j_{12} = I_{\text{Max}} \cdot (\text{Na}^+)_o \cdot (K_{\text{Na}} + (\text{Na}^+)_o)^{-1} \quad (33)$$

Die Untersuchung des Sättigungsverhaltens wurde dann durch Methoden erleichtert, die eine Bestimmung der Strom-Spannungskurve (IV-Kurve) der Außenmembran erlaubten. Die Methode, die ohne den Einsatz von Mikroelektroden auskommt, besteht darin, die Innenmembran zu depolarisieren, indem K^+ für Na^+ im Innenbad substituiert wird (Rawlins et al., 1970; Morel & Leblanc, 1973). Unter dieser Bedingung sollte das transepitheliale Potential dem Potential über die Außenmembran entsprechen. Die erhaltenen, um den mit Amilorid bestimmten Leckstrom korrigierten, IV-Kurven konnten der "constant-field" Gleichung im Bereich zwischen Null mV und dem Natriumgleichgewichtspotential E'_{Na} angepaßt werden (Fuchs et al., 1977).

Die Analysen der IV-Kurven zeigten, daß bei steigender Natriumkonzentration im Außenbad der aufgrund der "constant-field" Beziehung zu erwar-

tende Anstieg des Natriumeinstroms weitgehend durch eine Abnahme von P_{Na} aufgehoben wird.

Prinzipiell können zwei Sättigungsmechanismen unterschieden werden. Im einfachsten Fall findet der Transport durch jeden Kanal statt. Bei der Passage durch den Kanal interagiert Natrium mit einer oder mehreren Bindungsstellen, wobei ein Transportschritt begrenzend (rate-limiting) wird. Dieses Verhalten wird "Kanalsättigung" genannt. Formal ist es äquivalent zum Michaelis-Menten Typ einer Enzymsättigung durch ein Substrat. In diesem Fall würde K_{Na} die Dissoziationskonstante von Natrium und einem sättigbaren Ort vor oder im Kanal darstellen.

Eine Alternative zur "Kanalsättigung" würde darin bestehen, daß Natrium mit bestimmten modifizierbaren Bindungsstellen reagiert und dadurch die Transportratenkonstanten des Kanals abnehmen. Die Kanäle selbst werden in diesem Fall nicht durch Natrium gesättigt. Dies ist ein Analogon zum Phänomen der "Substrathemmung" bei Enzymkinetiken (Laidler, 1958).

Die beiden Mechanismen können durch das Reaktionsverhalten des Natriumstroms auf plötzliches Anwachsen der Substratkonzentration $(Na^+)_{\circ}$ unterschieden werden. Während im Fall der Kanalsättigung der Natriumeinstrom I_{Na} nicht vorübergehend den Gleichgewichtssättigungswert überschreiten kann, kann dies im Fall der Substrathemmung geschehen, vorausgesetzt daß der Modifizierungsprozeß ausreichend langsam abläuft. Entsprechende Konzentrationssprungexperimente an der isolierten Froschhaut zeigten ein Verhalten, das der Substrathemmungshypothese entspricht (Lindemann et al., 1972; Lindemann & Voute, 1976). Nach schlagartiger Erhöhung von $(Na^+)_{\circ}$ erreicht der Natriumstrom ein vorübergehendes Maximum und sinkt dann auf einen wesentlich niedrigeren Plateauwert ab ("recline phenomenon") (Lindemann & Gebhardt, 1973).

2.11 Wirkung von Novobiocin an der Froschhaut

Am Froschhautepithel bewirkt Novobiocin bei Zugabe zum Außenbad einen etwa 2- bis 3-fachen Anstieg des Kurzschlußstromes und damit des trans-epithelialen Nettonatriumstroms (Johnston und Hoshiko, 1971). Johnston und Hoshiko nahmen an, daß Novobiocin die Permeabilität der Außenmembran für Natrium erhöht. Cruz und Biber (1976) zeigten, daß der Natriumeinstrom über die apikale Membran gesteigert wird. In Übereinstimmung mit der vermuteten Wirkung Novobiocins auf die Natriumpermeabilität wurden von Rick und Mitarbeiter (1980) eine starke Zunahme der intrazellulären Natriumkonzentration (von etwa 10 mmol auf 25-30 mmol FG) beobachtet. Dabei wurde gefunden, daß die Zunahmen der intrazellulären Natriumkonzentration und des Kurzschlußstroms prozentual in etwa gleich groß sind. Unter der Voraussetzung, daß die Natriumpumpe an der Innenmembran nicht gesättigt ist, läßt sich die Steigerung der Pumprate allein durch die Zunahme der intrazellulären Natriumkonzentration erklären.

Die Wirkung von Novobiocin auf die intrazelluläre Natriumkonzentration und den Kurzschlußstrom konnte durch Amilorid vollständig aufgehoben werden. Das bekräftigt die Annahme einer spezifischen Wirkung auf die Außenmembran und zeigt, daß der Wirkungsmechanismus in einer Permeabilitätserhöhung oder Rekrutierung Amilorid-empfindlicher Transportkanäle gesehen werden muß.

2.12 Wirkung von Novobiocin auf andere Systeme

Novobiocin wurde 1956 entdeckt und isoliert (Goodman & Gilman, 1965). Das antibakterielle Wirkungsspektrum von Novobiocin ist der von Penicillin und Erythromycin sehr ähnlich. *Staphylococcus aureus* und *Pneumococci* reagieren am stärksten auf Novobiocin, gefolgt von *Streptococci* (Gruppe A) und *Strep. viridans*. Coli-artige Organismen (*A. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella* und *Pseudomonas*) werden von dieser Substanz nicht beeinflusst. Novobiocin wirkt sowohl bakteriostatisch wie bakterizid, wobei die bakterizide Wirkung möglicherweise überwiegt (Brock, 1962).

Novobiocin verursacht bei *Staph. aureus* eine Akkumulation von Zellwand-nukleotiden. Bei gram-positiven Bakterienzellen wird durch Novobiocin die Biosynthese von Teichonsäure gehemmt (Hughes et al., 1971). Zellwand- und Membran-Teichonsäuren nehmen am Ionenaustausch der äußeren Regionen dieser Bakterienzellen teil (Archibald & Armstrong, 1961; Heptinstall & Archibald, 1970). Die Phosphatgruppen der Wand-Teichonsäure sind verantwortlich für die Fähigkeit der Zellwände Magnesiumionen (Mg^{2+}) zu binden und so Mg^{2+} an der cytoplasmatischen Membran zu konzentrieren. Das Fehlen der Teichonsäure-Biosynthese führt zu einer durch Magnesiummangel induzierten Hemmung der Membranfunktion.

Sugino et al. (1978) berichteten, daß Novobiocin ($0.4 \mu M$) die DNA-Synthese von *Escherichia coli* über seine Wirkung auf die DNA-Gyrase, inhibiert. DNA-Gyrase ist ein ATP-verbrauchendes bakterielles Enzym, das das negative Drehen (supercoiling) der geschlossenen Doppel-DNA katalysiert (Gellert et al., 1976; Marians et al., 1977; Liu & Wang, 1978) und so die DNA in eine energetisch höhere Form bringt. Novobiocin wirkt antagonistisch zu ATP und verhindert die ATP-Bindung. So stoppt Novobiocin ($3.3 mM$) in permeabilisierten Zellen (gezüchtete L-Zellen der Maus) die DNA-Synthese,

wobei eine Erhöhung der ATP-Konzentration (1-5 mM) signifikant den inhibitorischen Novobiocineffekt erniedrigt (Nishio & Uyeki, 1982). Alle Reaktionen, die Energiezufuhr erfordern, einschließlich ATP-Hydrolyse, Supercoiling und Neuorientierung der Spaltungsorte, reagieren äußerst empfindlich auf Novobiocin (Sugino et al., 1977; Gellert et al., 1977), während nicht bekannt ist, daß Novobiocin auf irgendein anderes ATP-benötigendes Enzym bei niedrigen Konzentrationen wirkt.

Odland und Loennerholm (1982) führten an Hühnern Untersuchungen der aktiven Sekretion von renalen Tubuluszellen für Chlorothiazide, Hydrochlorothiazide und Clopamide durch. Sie stellten fest, daß diese Diuretika durch einen organischen Anionentransport sezerniert werden, der durch Novobiocin merklich reduziert wird. Dabei sind jedoch die Sekretion von organischen Kationen (z.B. Amilorid) durch Novobiocin unbeeinflusst (Fujimoto et al., 1973; Odland, 1981) und der saluretische Gesamteffekt der Diuretika nicht beeinflusst, d.h. Novobiocin wirkt nicht auf die renale Elektrolytexkretion an sich (Odland, 1979).

3. METHODE

3.1 Präparation der Haut

Die Versuche wurden an Fröschen der Spezies *Rana esculenta*, in einigen Experimenten der Spezies *Rana temporaria*, durchgeführt. Die Frösche wurden bis zu ihrer Verwendung in Plastikbecken unter fließendem Leitungswasser bei ca. 15° C ohne Futter gehalten.

Für die Experimente wurden die Frösche durch Dekapitieren und Sondieren des Rückenmarks getötet. Daraufhin wurde die Bauch- und Beinhaut sorgfältig mit Schere und Pinzette abpräpariert, wobei darauf geachtet wurde, daß die Haut keine Beschädigungen durch Schnitt- oder Quetschverletzung erhielt. Die abpräparierte Haut wurde durch Eintauchen in isotone Froschringelösung von eventuellen Blut- und Schleimresten befreit und unter leichter Spannung auf eine Unterlage geheftet. Mit Hilfe von Cyanoacrylat-Kleber (Uhu-Sekundenkleber oder Bindulin 2000) wurde die abdominale Haut und die Beinhaut mit der epithelialen Seite auf Ringe geklebt. Diese "Hautringe" wurden in isotonem Froschringer aufbewahrt, bis sie in die Inkubationskammer (nach Ussing, siehe unten) eingesetzt wurden.

3.2 Inkubation der Haut

3.2.1 Kurzschlußstrommethode

Die Häute wurden in Plexiglaskammern, sogenannten Ussing-Kammern, inkubiert, die mit Strom- und Spannungselektroden versehen sind. Abb. 5 zeigt das Prinzip der Kurzschlußanordnung nach Ussing und Zerahn, 1951.

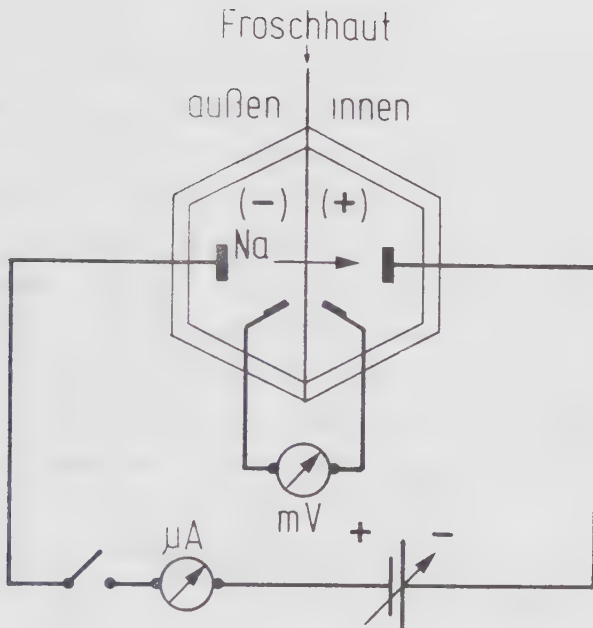


Abb. 5: Kurzschlußstromanordnung (nach Ussing und Zerhan, 1951). Die transepitheliale Potentialdifferenz wird über ein Elektrodenpaar mit einem mV-Meter bestimmt. Über ein zweites Elektrodenpaar kann mit Hilfe einer variablen äußeren Gegenspannung das Potential auf Null gebracht werden.

Das Ziel dieser Anordnung besteht in der Ausschaltung äußerer passiver treibender Kräfte, die ein Ungleichgewicht der unidirektionalen Substanzflüsse verursachen könnten. Dazu wird die Haut auf beiden Seiten mit der gleichen Badelösung umgeben und das Hautpotential durch eine äußere Stromquelle auf Null kompensiert. Unter diesen Bedingungen, d.h. unter Abwesenheit äußerer energetischer Gradienten, kann eine Differenz der unidirektionalen Flüsse nur auf einen aktiven Substanztransport zurückgeführt werden. Ussing und Zerahn (1951) beobachteten unter Kurzschlußbe-

dingungen an der Froschnaut eine Differenz der unidirektionalen Natriumflüsse. Dabei entsprach der Netto-Natriumtransport (I_{Na}) quantitativ dem Strom im äußeren Stromkreis (Kurzschlußstrom, I_{sc}). Die Identität von Netto-Natriumtransport und Kurzschlußstrom konnte unter einer Reihe experimenteller Bedingungen nachgewiesen werden, bei denen der Natriumstrom z.T. stark stimuliert oder gehemmt wurde (Ussing und Zerahn, 1951; Kirschner, 1955; Koefoed-Johnsen, 1957; Koefoed-Johnsen und Ussing, 1958; Curran et al., 1963; Dörge & Nagel, 1970; Dörge et al., 1977). Damit steht mit dem Kurzschlußstrom unter diesen Voraussetzungen ein leicht meßbarer, quantitativer Parameter der transepithelialen Natriumtransportleistung zur Verfügung.

3.2.2 Punktionskammer

In Abb. 6 ist die bei den Punktionsuntersuchungen verwendete Inkubationskammer dargestellt. Zwischen die beiden Halbkammern wird das durch den Plexiglasring fixierte Hautstück eingesetzt. Die Abdichtung zwischen unterer Kammerhälfte und Haut erfolgt durch einen O-Ring. Um Randeffekte zu vermeiden, die durch Quetschung der Haut auftreten können (Dobson & Kidder, 1968; Helman & Miller, 1974) wurde dieser Bereich durch Silikonfett abgedichtet. Die Haut lag mit der corialen Seite auf einer festen Unterlage (grobkörnige Filtersteinscheibe) auf. Um ein übermäßiges Verschieben der Haut bei der Punktion (Punktionswinkel zwischen 45° und 80°) zu verhindern, wurde die Haut durch einen leichten Unterdruck (~ 15 cm H_2O) auf die Unterlage gesogen.

Die epitheliale Hautfläche war mit einer Oberfläche von ca. 3.2 cm^2 der Punktion zugänglich. Während die Perfusion des Innenbades bei allen Ver-

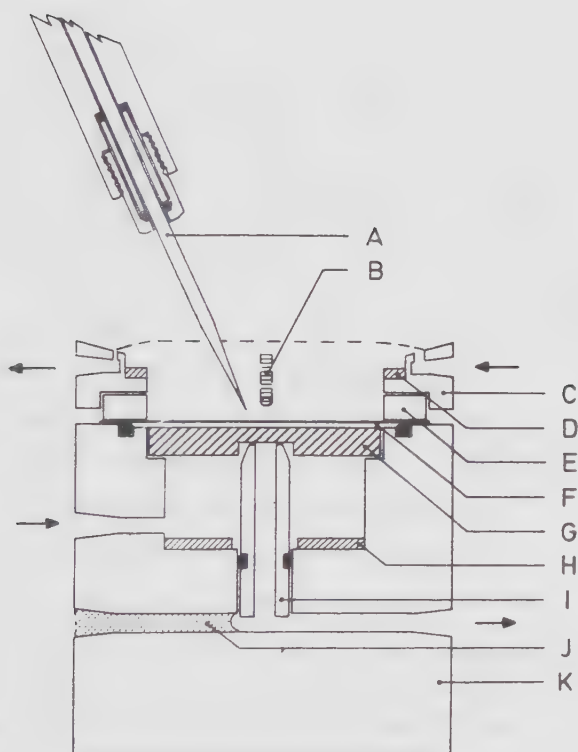


Abb. 6: Querschnitt durch die Punktionskammer (schematisch). A = Mikroglaselektrode, B = KCl-Agarbrücke zur Potentialelektrode des Außenbades (Epithelseite), C = epitheliale Halbkammer, D = Ag/AgCl-Stromelektrode, E = Ring zur Befestigung der Haut, F = Haut, G = Unterlage für die Haut, H = Ag/AgCl-Stromelektrode, I = Fortsetzung des Auslaufs, J = KCl-Agarbrücke zur Potentialelektrode des corialen Bades, K = coriale Halbkammer. Die gefüllten Kreise sind Gummi O-Ringe, die die verschiedenen Teile der Kammer abdichten. Pfeile bezeichnen Zu- bzw. Abläufe.

suchsbedingungen konstant war, konnte die Perfusionsgeschwindigkeit des Außenbades variiert werden.

Das Hautpotential wurde durch gesättigte KCl-Agar gefüllte Flüssigkeitsbrücken gemessen, die mit Ag/AgCl-Pellets (E 201, 2 x 4 mm, Science Trading, Frankfurt) in Verbindung standen. Die chlorierte Silberplatte im Innenbad bzw. der Silberring im äußeren Bad dienten als Stromelektroden.

3.2.3 Inkubationskammer

Parallel zu den Versuchen mit Mikroelektroden wurden Experimente in Kurzschlußkammern durchgeführt. Sie bestehen aus zwei abgeschlossenen Halbkammern und sind im Prinzip wie die Punktionskammer aufgebaut. Abbildung 7 gibt einen Längsschnitt durch eine Halbkammer wieder. Das Hautpotential wurde bei diesen Experimenten mit Kaiomelektroden (Firma Pustl, München) bestimmt. Die beiden Kammerhälften wurden mit Hilfe von Rollerpumpen perfundiert. Das Kammervolumen betrug 2 ml und konnte bei normaler Perfusionsrate in etwa 0.5 bis 1 Min. vollständig ausgetauscht werden. In schnellen Austauschexperimenten war ein Lösungswechsel der äußeren Halbkammer in weniger als 0.3 sec möglich.

3.3 Registrierung der elektrischen Hautparameter

Die elektrischen Funktionsparameter der Haut, wie Potentialdifferenz (PD), Kurzschlußstrom (I_{sc} = short-circuit-current) und Leitfähigkeit (g_t) bzw. Hautwiderstand (R_t) wurden mit Hilfe einer elektronischen Schaltung gemessen (Eigenbau, Rick & Fründt), deren vereinfachtes Blockschaltbild in Abb. 8

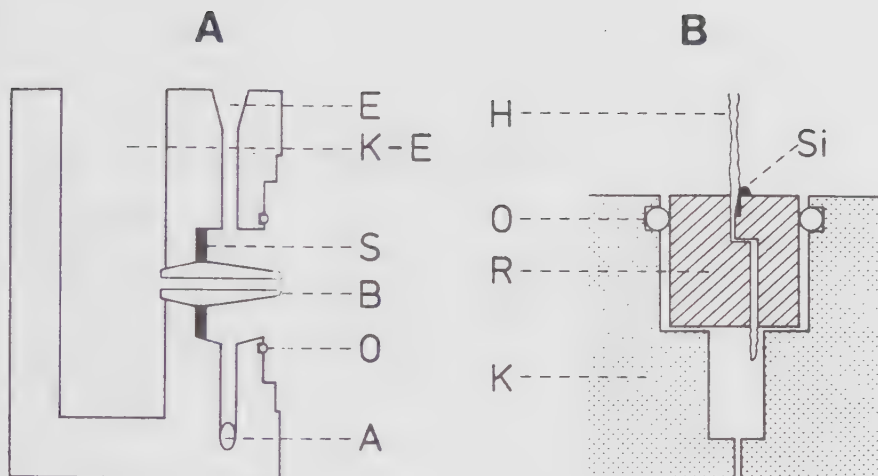


Abb. 7: Schnittbild durch eine Inkubationskammerhälfte (A) und vergrößertes Schnittbild der Befestigung der Haut im Ring (B). E = Einlauf; K-E = Bohrung für die Aufnahme der Kalomelektrode; S = Silberplatte; B = Agar-Brücke; O=O-Ring; A = Auslauf; H = Haut; R = Ring; K = Kammer; Si = Silikonfett.

wiedergegeben ist. Die Differenz der meist sehr geringen Eigenpotentiale der Elektroden (Ag/AgCl-Pellets) wurde vor den Versuchen auf Null abgeglichen. Der Eingangswiderstand des Kurzschlußautomaten war $> 10^9$ Ohm. Die Haut wurde in kurzgeschlossenem Zustand inkubiert, d.h. das Hautpotential auf 0 mV kompensiert. Die Zeitkonstante der Stromkompensation, die variabel zu wählen war, wurde auf 30 msec oder 100 msec festgelegt.

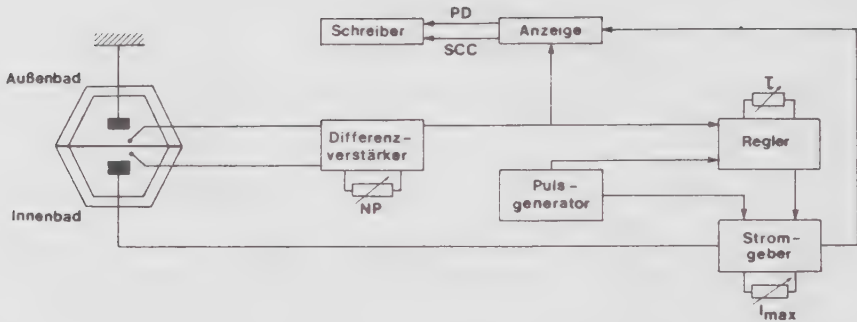


Abb. 8: Blockschaltbild des Kurzschlußstromautomaten. PD = Potentialdifferenz, SCC = Kurzschlußstrom, NP = Nullpunktsabgleich, $I_{\max}$ = Strombegrenzung, t = Zeitkonstante.

Die Hautleitfähigkeit wurde durch Testpulse von $-10 \mu\text{A}$, von etwa 1 sec Dauer bestimmt ($I = f(U)$). Alle Hautparameter (I_{sc} und g_t bzw. V_t und R_t) wurden auf einem 4-Kanal-Schreiber (W + W Recorder, Modell 316, Kontron Elektronik, 8057 Eching) fortlaufend und gleichzeitig mit den Mikroelektrodenmeßdaten (siehe 3.6) registriert. Die Pulsform konnte auf einem Kathodenstrahloszillograph kontinuierlich überprüft werden.

3.4 Herstellen und Testen der Mikroelektroden

Die Mikropipetten wurden aus dünnwandigen Filament-Borosilikatglaskapillaren (Hilgenberg, Malsfeld) angefertigt. Diese Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 1.5 mm und einem Innendurchmesser von 0.75 mm waren vom Hersteller gereinigt und auf eine Länge von 100 mm zugeschnitten. Ein rasches und blasenfreies Füllen der Mikropipetten ermöglichte das Borosilikatfilament (Durchmesser ca. 0.15 mm) an der Innenwand der Glaskapillare. Aus diesen Glaskapillaren wurden in einem Vertikal-Mikropipetten-Puller (David Kopf Instruments, Model 700 C) Mikropipetten mit einem Spitzendurchmesser $< 1 \mu\text{m}$ gezogen. Die Pipetten wurden bis zur Verwendung (etwa 3 - 6 Stunden später) trocken in Zimmerluft aufbewahrt. Vor dem Einsetzen in den Mikroelektrodenhalter (siehe unten) wurden die Pipetten mit 3 M KCl-Lösung von der Rückseite blasenfrei gefüllt. Diese Füllungs-lösung erscheint als sehr geeignet, da die Beweglichkeiten von K^+ und Cl^- nahezu gleich groß sind und so das "liquid-junction-Potential" (Potential zwischen den Verbindungsflächen von KCl-Lösung in der Elektrode und Lösung außerhalb (intrazelluläre Lösung)) klein und konstant gehalten werden kann. Die KCl-Lösung enthielt zusätzlich 1.5 mM Na-Citrat, um die mit der Zeit zunehmende Hydratation an der Elektrodenspitze zu reduzieren und so das Spitzenpotential möglichst gering zu halten. Als Spitzenpotential (tip potential) bezeichnet man die nach Abbrechen der Elektrodenspitze beobachtbare Potentialdifferenz.

Die gefüllte Mikropipette wurde in einem Elektrodenhalter aus Plexiglas durch zwei in Abstand von ca. 2 cm angebrachte O-Ringe so befestigt, daß longitudinale und vorallem auch transversale Schwingungen möglichst vollständig unterbunden waren (siehe Abb. 6). Für die elektrische Verbindung

zwischen Mikroelektrode und Kabel, das zum Verstärkereingang führte, diente ein Ag/AgCl-Pellet (2 x 4 mm), das durch die Elektrodenfülllösung (3 M KCl + 1.5 mM Na-Citrat) in blasenfreiem Kontakt zur Mikroelektrode stand.

Der Elektrodenhalter war durch ein Gewinde fest mit dem Punktionsmanipulator, bestehend aus einem Piezoantrieb, gekoppelt mit einem Schrittmotor (PM 500-20, Frankenberger, Germering) verbunden. Das Gerät erlaubt variable Schrittlängen von 0.25 - 25 μm .

Der Elektrodenverstärker (Eigenbau, Rick & Sessler) hatte einen Eingangswiderstand $> 10^{10}$ Ohm. Die Abschirmung der Elektrode war getrieben d.h. sie wurde auf Elektrodenpotential geregelt, um kapazitive Effekte zu eliminieren. Zur Bestimmung des Elektrodenwiderstandes wurde ein Konstantstromgenerator verwendet. Ein definierter Gleichstromimpuls (± 2 pA) durch den Mikroelektrodenwiderstand ruft eine rechteckigförmige Potentialantwort hervor. Die Höhe der Potentialstufe, die vom Verstärker erfaßt wird, ist also vom Ohm'schen Widerstand der Elektrode abhängig. Um die korrekten Potentialwerte der Mikroelektrode ablesen zu können, war der Verstärkerausgang mit einem Digitalvoltmeter, einem Oszillograph und dem Schreiber verbunden (siehe 3.3).

3.5 Inkubationslösungen

Während der Kontrollperiode (Kontroll- i_{sc}) waren die Häute von beiden Seiten mit Ringerlösung umgeben. Die normale Ringerlösung enthielt 110 mM NaCl, 2.5 mM KHCO_3 und 1 mM CaCl_2 . TRIS-Ringer beinhaltete 111 mM TRIZMA-Base, 2.5 mM KCl und 1 mM CaCl_2 und war mit HCl auf

einen pH 7.5 eingestellt. Phosphatringer setzte sich aus 107 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 und 3 NaH_2PO_4 zusammen. Durch Zugabe von NaOH wurde der gewünschte pH erhalten. Lösungen mit verminderter Natriumkonzentration wurden durch Mischen mit geeigneten Mengen von TRIS-Ringer und Phosphatringer (pH = 7.5) oder durch Ersetzen von NaCl des normalen Froschringers durch äquimolare Mengen von KCl hergestellt. Cl-freier Ringer enthielt 55 mM Na_2SO_4 , 2.5 mM KHCO_3 , 1 mM CaSO_4 und 30 mM Saccharose. Novobiocin (Boehringer, Mannheim) wurde als Natriumsalz der Novobiocinsäure verwendet. In Experimenten mit niedriger Natriumkonzentration wurde der Natriumgehalt von Novobiocin mit in die Gesamtkonzentration einberechnet. Diltiazem wurde von der Firma Gödecke AG, Freiburg geliefert. Amilorid/HCL (Merck, Sharp & Dohme, München) wurde in Konzentrationen von 3×10^{-5} M und 10^{-4} M zur Außenlösung gegeben. TEA/HCl (Sigma), BaCl_2 , Glucose oder Pyruvat-haltige Lösungen wurden durch Mischen mit pH adjustierten isotonischen Stammlösungen hergestellt. Alle Lösungen waren mit Zimmerluft äquilibriert. Bei Durchperlung mit Luft variierte der pH der HCO_3^- -haltigen Lösungen zwischen 8.0 und 8.3. Bei den Mikropunktionsversuchen war die Innenbadlösung immer normaler Froschringer.

3.6 Intrazelluläre Potentialbestimmungen

Nur Mikroelektroden mit einem Widerstand zwischen 35 - 45 Megaohm (Spitzenpotential ~ 5 mV) und einer ruhigen und konstanten Außenbadpotentialaufzeichnung (= 0 mV) wurden für die Punktionsuntersuchungen verwendet. Die Mikroelektrode wurde mit Hilfe des Schrittmotors bis an die Epitheloberfläche (erster Hautkontakt) gebracht. Um zu verhindern, daß

eine Punction an einer durch diesen ersten Hautkontakt beschädigten Zelle erfolgte, wurde die Elektrodenspitze $2\text{ }\mu\text{m}$ zurückgezogen und lateral um etwa $50\text{ }\mu\text{m}$ verschoben; durch Piezosprünge von $3\text{ }\mu\text{m}$ Länge wurde dann die Punction von Epithelzellen vorgenommen. Konnten für mehrere Minuten stabile Werte für das intrazelluläre Potential (U_o) und den fraktionellen Widerstand ($f(R_o)$) erhalten werden, wurde als Test für die intrazelluläre Lokalisation der Elektrode Amilorid ($3 \times 10^{-5}\text{ M}$) zugegeben. Nur für den Fall, daß das Zellpotential unter Amilorid weiteranstieg (Hyperpolarisation) und der fraktionelle Widerstand $f(R_o)$ Werte > 0.98 erreichte (Nagel, 1976a; 1978b; 1980; Nagel & Essig, 1982), wurde nach Auswasch von Amilorid und Wiedererreichen der Kontrollwerte mit den weiteren Versuchsbedingungen fortgefahren.

Auf dem Schreiber wurden gleichzeitig der Kurzschlußstrom (I_{sc}), die trans-epitheliale Leitfähigkeit der Haut (g_t) sowie das intrazelluläre Potential (U_o) und der fraktionelle Widerstand ($f(R_o)$) aufgezeichnet. Der fraktionelle Widerstand $f(R_o)$ gibt das Verhältnis des Widerstandes an der apikalen Membran R_o zum Gesamtwiderstand des Epithels ($R_t = R_o + R_i$, wobei R_i = Widerstand der Innenmembran) an: $f(R_o) = R_o \cdot (R_o + R_i)^{-1}$.

3.7 Punktionskriterien

Wie schon oben erwähnt, wurden nur niederohmige Mikroelektroden ($35 - 45\text{ M}\Omega$), die im allgemeinen Spitzenpotentiale von $0 - 5\text{ mV}$ aufwiesen, verwendet.

Zusätzlich wurden folgende Forderungen für akzeptable Punktionsdaten gestellt:

- i) Der Elektrodenwiderstand nach der Punction durfte nicht mehr als $\pm 10\%$ vom Ausgangswiderstand abweichen.

- ii) Beim Wiedereintritt der Elektrode in das Außenbad nach der Punktion, durfte das Potential nicht von 0 mV abweichen.
- iii) Bei wiederholten Punktionen oder Messungen in tieferen Epithelschichten mußten in etwa identische Werte für U_0 und $f(R_0)$ gemessen werden.
- iv) Bei Zugabe von Amilorid (ohne Novobiocin) (3×10^{-5} M) zum Außenbad mußte U_0 hyperpolarisieren und $f(R_0)$ einen Wert nahe 1.0 erreichen.
- v) Über mindestens 10 Minuten mußten während der Kontrollperiode sowohl die $f(R_0)$ -Werte konstant als auch die Aufzeichnung der zellulären Potentiale U_0 stabil (Schwankungsbreite 1 - 3 mV) bleiben.

Beobachtungen transienter und kapazitiver Änderungen des Potentials, hervorgerufen durch die Testimpulse (Brown & Kastella, 1965; Smith, 1971), wurden nicht als Kriterium hinzugezogen, da sie wegen der langsamen Zeitauflösung des Schreibersystems nicht dokumentiert werden konnten.

3.8 Auswertung der Punktionsmeßdaten

Grundlage für die mathematische Bestimmung des passiven Ionentransports, beschrieben als eine Elektrodiffusion durch Na^+ - oder K^+ -spezifische Membrankanäle, ist die allgemeine "constant-field"-Gleichung (Gleichung 22). Die Leitfähigkeit der passiven Transportkanäle ändert sich mit der Konzentration der permeierenden Ionenart in den Lösungen, die die Membran umgeben. Zusätzlich hängt die Leitfähigkeit auch vom Potentialprofil über eine Membran ab. Als Vereinfachung soll angenommen werden, daß es sich um Elektrodiffusion durch homogene Kanäle handelt (Lindemann, 1977a,b).

Für das Froschhautepithel kann dieser Transportmechanismus für den Natriumeinstrom über die apikale Membran der transportierenden Zellen angewandt werden (Fuchs et al., 1977; Lindemann & van Driessche, 1977).

Gleichung (22) auf Natrium bezogen lautet:

$$I_{Na} = P_{Na} \cdot \frac{AF^2 U_0}{RT} \cdot \frac{(Na^+)_o - (Na^+)_i \exp(-FU_0/RT)}{\exp(-FU_0/RT) - 1}, \quad (34)$$

Durch Umstellen von 34 ergibt sich die Bestimmungsgleichung für P_{Na} :

$$P_{Na} = \frac{I_{Na} \cdot RT}{AF^2 U_0} \cdot \frac{\exp(-FU_0/RT) - 1}{(Na^+)_o - (Na^+)_i \exp(-FU_0/RT)} \quad (35)$$

Diese Gleichung ist leicht lösbar. Ein Teil der Größen in Gleichung 35 sind Konstanten ($A = 3.2 \text{ cm}^2$, $(Na^+)_o = 110 \text{ mM}$) während andere wie I_{Na} ($= I_{sc}$) und U_0 als Meßgrößen erhalten werden. Die intrazellulären Natriumkonzentrationen $((Na^+)_i)$ wurden aus parallelen Untersuchungen mit der Elektronenstrahlmikroanalyse erhalten (siehe 3.9).

Um die sogenannte "slope-conductance" dg_{Na} zu bestimmen, muß Gleichung 34 nach U_0 differenziert werden. dg_{Na} gibt an, wie stark sich der Natriumeinstrom über die apikale Membran bei einem bestimmten Potential U_0 ändert, wenn dieses U_0 um einen infinitesimal kleinen Betrag von U_0 variiert wird.

$$dg_{Na} = \frac{dI_{Na}}{dU_0} = P_{Na} \cdot \frac{AF^2}{RT} ((Na^+)_o \cdot K_1(U_0) + (Na^+)_i \cdot K_2(U_0)) \quad (36)$$

$$\text{mit } K_1(U_0) = \frac{1 - \exp(-FU_0/RT) - (FU_0/RT) \exp(-FU_0/RT)}{(1 - \exp(-FU_0/RT))^2} \quad (37a)$$

$$\text{und } K_2(U_0) = \frac{\exp(-FU_0/RT) (\exp(-FU_0/RT) + (FU_0/RT) - 1)}{(1 - \exp(-FU_0/RT))^2} \quad (37b)$$

Durch Einsetzen von 34 in 35 ergibt sich dann eine von P_{Na} unabhängige, nur von den Meßgrößen (I_{Na} , U_0 , $(Na^+)_i$) und Konstanten abhängige Gleichung für dg_{Na} (mS/cm^2).

Im Gegensatz zu dg_{Na} errechnet sich die Natriumleitfähigkeit der Außenmembran g_{Na} ("chord conductance") (mS/cm^2), wie eine Ohm'sche Leitfähigkeit aus dem Quotienten von I_{Na} zur effektiven treibenden Kraft $U_0 - E'_{Na}$.

$$g_{Na} = \frac{I_{Na} \cdot A^{-1}}{U_0 - \frac{RT}{F} (\ln(Na^+)_i - \ln(Na^+)_o)} \quad (mS/cm^2) \quad (38)$$

Abbildung 9 zeigt die sich aus der constant-field-Gleichung ergebende Strom-Spannungsbeziehung. In der Abbildung sind die Parameter dg_{Na} und g_{Na} eingezeichnet. Numerisch wurden sie und P_{Na} mit Hilfe eines Computer-Programmes berechnet. Es läßt sich eindeutig erkennen, daß dg_{Na} größer als g_{Na} ist.

Über die Bestimmung des fraktionellen Widerstandes $f(R_o)$ und der transepithelialen Leitfähigkeit g_t (mS/cm^2) konnten weitere Parameter abgeleitet werden. Die transzelluläre Leitfähigkeit g_{tc} ergibt sich aus der Differenz $g_t - g_{sh}$. Die "shunt"-Leitfähigkeit g_{sh} ist die unter maximaler Amiloridwirkung bestimmte transepitheliale Leitfähigkeit g_t . Weiter lassen sich die Ohm'schen Größen wie Leitfähigkeit der apikalen Membran $g_o = g_{tc} \cdot f(R_o)^{-1}$ (mS/cm^2) und der Innenmembran $g_i = g_{tc} (1 - f(R_o))^{-1}$ errechnen.

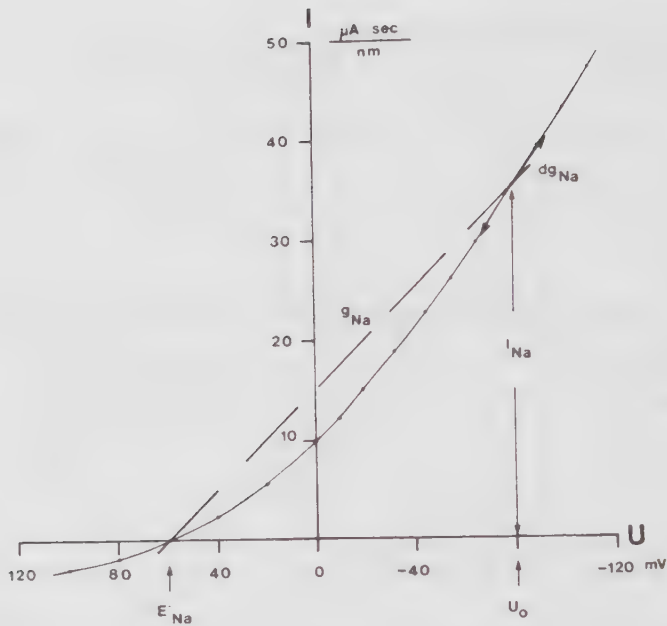


Abb. 9: Stromspannungskurve nach Goldman, konstruiert für Natriumkonzentrationen im Verhältnis außen zu innen von 10 : 1. Die angegebenen Stromwerte I entsprechen Kurzschlußströmen in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$, bezogen auf eine Natriumpermeabilität $P_{\text{Na}} = 10 \text{ nm}/\text{sec}$.

In Abbildung 10 ist ein stark vereinfachtes Äquivalentschaltbild für Epithelzellen der Froschhaut gezeigt. E_0 und E_i representieren die effektiven elektromotorischen Kräfte, bezogen auf Natrium und Kalium über die apikale und basolaterale Membran.

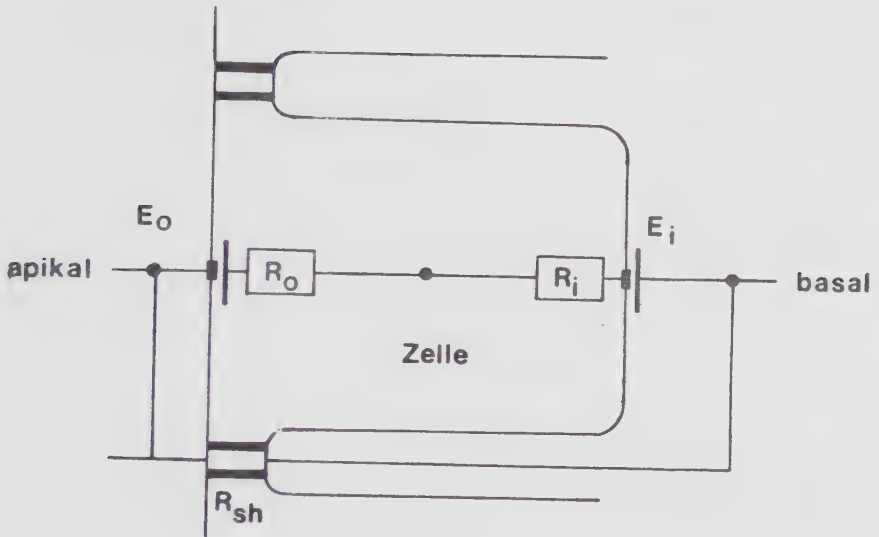


Abb. 10: Äquivalentschaltbild für Epithelzellen der Froschhaut (nach Nagel, 1979). R_{sh} = "shunt"-Widerstand ($= g_{sh}^{-1}$), E_o , E_i = Gleichgewichtspotential der äußeren bzw. inneren Membranbarriere.

3.9 Elektronenstrahlmikroanalyse

Parallel zu den Untersuchungen mit Mikroelektroden wurden an den gleichen Fröschen Bestimmungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen durchgeführt. Die Hautstücke wurden zu diesem Zweck wie in 2.3 beschrieben inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationsversuche wurden die Ringe aus den Kammern herausgenommen, die Außenseite kurz mit Filterpapier abgetupft und

mit einer dünnen Schicht Albuminlösung überschichtet. Das Einfrieren der Haut erfolgte durch rasches Eintauchen der Ringe in flüssiges Propan (-190°C) oder in ein Propan/Isopentan-Gemisch in der Zusammensetzung 3 : 1 (-196°C). Der maximale Zeitverbrauch zwischen Herausnehmen der Haut aus der Kammer und Einfrieren war 15 sec. Die Haut wurde anschließend unter flüssigem Stickstoff (-196°C) in etwa 2-3 mm große Stücke gebrochen. Anschließend wurden in einem Reichert Ultramikrotom Gefrierschnitte (Dicke $\geq 1\text{ }\mu\text{m}$) hergestellt und die Schnitte bei -80°C und 10^{-6} Torr für etwa 10 Stunden gefriergetrocknet (Dörge et al., 1978).

Die Röntgenmikroanalyse der Schnitte wurde in einem Rasterelektronenmikroskop (Cambridge Steroscon S150) durchgeführt, das mit einem energiedispersiven Röntgendetektor (National Semiconductor, LINK) ausgerüstet ist. Die Auswertung der so aufgenommenen Spektren erfolgte mit Hilfe eines Rechnerprogramms (Bauer und Rick, 1978). Das Quantifizieren der zellulären Elementkonzentrationen erfolgte durch einen Vergleich der elementcharakteristischen Linienintensitäten des Spektrums in der Zelle mit denen eines "internen" Standards, der in der miteingefrorenen Albuminlösung bestand. Eine genaue Beschreibung dieser nur angedeuteten Verfahrensweisen sowie eine Diskussion dieser Methode ist bei Rick (1980) zu finden.

4. ERGEBNISSE

4.1 Transepitheliale Funktionsparameter

Abbildung 11 zeigt die typische Reaktion einer isolierten Haut der Froschspezies *Rana esculenta* auf die Zugabe von 1 mM Novobiocin zur äußeren (apikalen) Badelösung – Zugabe von Novobiocin zum Innenbad bewirkt eine variable Hemmung des I_{sc} –. Innerhalb weniger Minuten verdoppeln sich Kurzschlußstrom I_{sc} (obere Kurve) und transepitheliale elektrische Potentialdifferenz V_t (untere Kurve) nahezu. Gleichzeitig sind eine signifikante Erhöhung der transepithelialen Leitfähigkeit g_t (Ausschläge der I_{sc} -Kurve) bzw. eine Reduzierung im transepithelialen Widerstand R_t (Ausschläge der V_t -Kurve) deutlich erkennbar. Die durch Novobiocin hervorgerufene Stimulation von I_{sc} und V_t wird durch die Gabe von Amilorid (10^{-4} M) auf Werte nahe Null reduziert.

Tabelle 3 faßt die Effekte von Novobiocin, nach Einstellen eines Gleichgewichts, für die beiden untersuchten Froscharten zusammen. Bei Fröschen der Spezies *Rana esculenta* kommt es zu einer weitaus stärkeren Erhöhung von I_{sc} und V_t als bei *Rana temporaria*. Die mittlere Zunahme des I_{sc} beträgt bei *Rana esculenta* $199 \pm 151\%$ ($n = 84$), bei *Rana temporaria* lediglich $41 \pm 29\%$ ($n = 21$). In Abb. 12 ist die Novobiocin bedingte Stimulation des I_{sc} als Funktion des I_{sc} unter Kontrollbedingungen angegeben. Bei beiden Froscharten ist die relative Stimulation bei niedrigen Kontrollwerten viel größer. Die berechnete lineare Regression besitzt eine Steigung von etwa 1.0, was zu der Annahme führen kann, daß die absolute I_{sc} -Änderung vom Ausgangs- I_{sc} unabhängig ist. Die Streuung der Daten erklärt sich

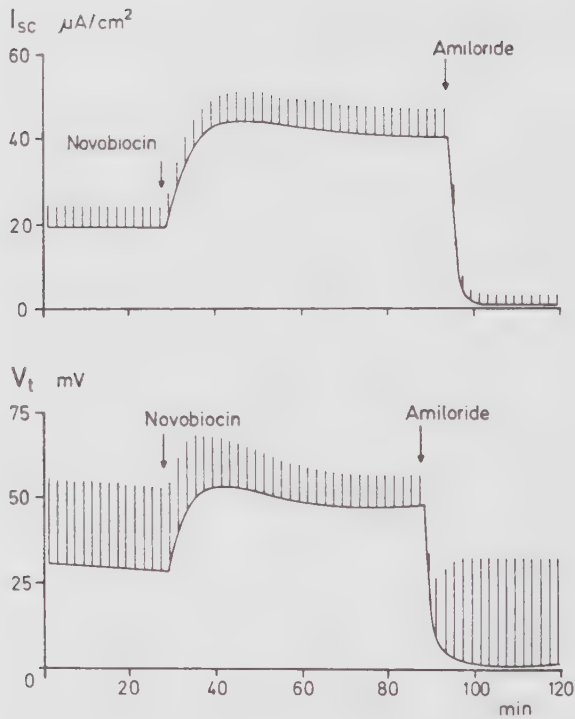


Abb. 11: Wirkung von Novobiocin (1 mM) und Amilorid (0.1 mM) auf I_{sc} und V_t der isolierten abdominalen Haut von *Rana esculenta* (Experiment wurde an zwei Stücken derselben Haut durchgeführt). Die Größe der Ausschläge im I_{sc} und V_t liefert Messungen von g_t bzw. R_t .

		I_{sc} $\mu A/cm^2$	g_t mS/cm^2	V_t mV	R_t $k\Omega \cdot cm^2$
<i>Rana esculenta</i>					
Kontrolle		16.4 ± 12.8	0.489 ± 0.237	21.6 ± 5.5	4.00 ± 0.87
Novobiocin		40.1 ± 16.0^a	0.697 ± 0.282^a	55.5 ± 8.9^a	2.76 ± 0.56^a
(n)		106	106	21	21
<i>Rana temporaria</i>					
Kontrolle		24.4 ± 18.1	0.455 ± 0.265	27.9 ± 6.8	4.72 ± 1.13
Novobiocin		32.5 ± 20.5^b	0.510 ± 0.279	39.2 ± 11.2^b	3.89 ± 0.93^b
(n)		24	24	7	7

Tabelle 3: Wirkung von Novobiocin (1 mM) auf transepitheliale Transportparameter (Mittelwerte $\pm$ SD, Zahl der Versuchshäute). Die Werte wurden direkt vor und 15 Min. nach Zugabe von Novobiocin abgelesen. Alle Novobiocinwerte sind statistisch signifikant unterschiedlich von den Kontrollwerten. Die beiden P-Werte sind <0.01 (a) und <0.05 (b).

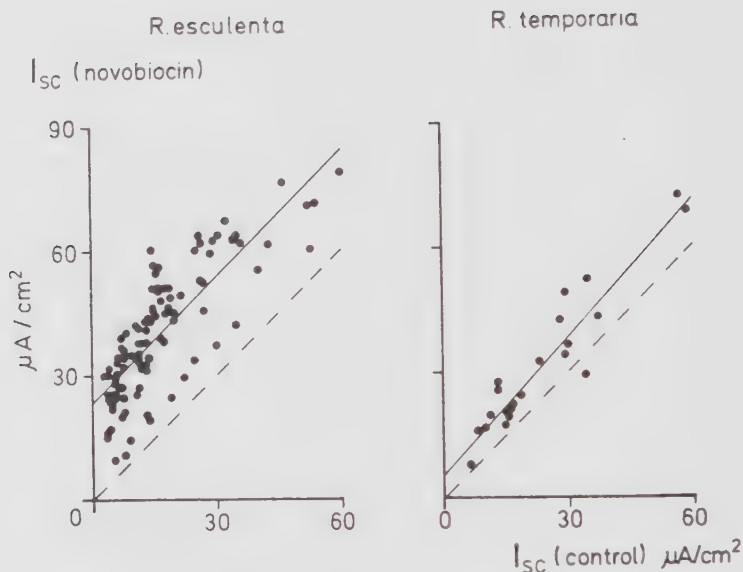


Abb. 12: , Korrelation zwischen I_{sc} -Werten, erhalten vor (Kontrolle) und nach Zugabe von 1 mM Novobiocin bei *Rana esculenta* (links) und *Rana temporaria* (rechts). Die linearen Regressionsgeraden beschreiben die Funktionen $y = 23.4 + 1.02x$ (*Rana esculenta*) und $y = 5.4 + 1.10x$ (*Rana temporaria*). Der jeweilige r -Wert war 0.82 bzw. 0.97.

zum Teil aus jahreszeitlichen Variationen der Reaktion auf Novobiocin. Während des Sommers (Juni bis September) wurde eine deutlich niedrigere absolute und relative I_{sc} -Antwort beobachtet, verglichen zum Rest des Jahres. Im folgenden werden, falls nichts anderes angegeben, nur Ergebnisse von Versuchen mit *Rana esculenta* dargestellt.

Die Zeit des halbmaximalen I_{sc} -Anstiegs, $t_{1/2}$, variierte zwischen 0.3 und

8 Minuten. Im allgemeinen konnte mehr als eine Zeitkonstante unterschieden werden, die schnellste, die mit der normalen Austauschzeit der apikalen Inkubationskammer beinahe übereinstimmte, schwankte zwischen 0.5 und 1 Minute. Bei Experimenten mit kurzen Austauschzeiten (< 0.3 sec) betrug die initiale I_{sc} -Anstiegsphase $2.5 \pm 1.2 \% \text{ sec}^{-1}$ ($n = 5$) der maximalen I_{sc} -Änderung; dies entspricht einer $t_{1/2}$ -Zeit von 0.47 Minuten. Die Wirkungsgeschwindigkeit von Novobiocin zeigte, verglichen mit der von Amilorid, keine beobachtbare Verzögerung.

Die I_{sc} - und V_t -Reaktionen auf Novobiocin wurden bis 120 Minuten lang verfolgt und waren im allgemeinen über diesen Zeitraum stabil. Langfristige Änderungen des durch Novobiocin stimulierten I_{sc} waren in den meisten Fällen von parallelen Veränderungen im Kontrollverlauf des I_{sc} , der an einem Kontrollhautstück bestimmt wurde, begleitet (siehe Abb. 11). In einigen Fällen war ein starker sekundärer Leitfähigkeitsanstieg (g_t) bzw. eine äquivalente Widerstandsabnahme (R_t) zu beobachten, welche mit einem deutlichen Absinken von V_t (siehe Abb. 11) und gewöhnlich auch mit einer leichten Reduzierung im I_{sc} einherging. Alle Effekte von Novobiocin, einschließlich der sekundären g_t - oder R_t -Änderungen, waren mit dem Auswaschen des Antibiotikums vollständig reversibel. Sowohl der Novobiocin stimulierte I_{sc} als auch der Kontroll- I_{sc} waren nicht signifikant von der Verfügbarkeit metabolischer Substrate wie Glucose (10 mM) oder Pyruvat (5 mM) abhängig. Der sekundäre Leitfähigkeitsanstieg g_t konnte auch in Anwesenheit dieser Substrate beobachtet werden. Wiederholte Applikation von Novobiocin zeigte eine kleine Abschwächung seiner Wirkung. Nach dem Auswasch der Substanz kehrte I_{sc} zu Kontrollwerten zurück. Im allgemeinen war dies auch der Fall für die induzierten Änderungen in V_t , g_t oder R_t .

obwohl es öfter deutlich länger dauerte, bis diese Effekte zurückgingen (siehe Abb. 15). Große sekundäre g_t und R_t Änderungen waren gewöhnlich nicht vollständig reversibel. Bei schnellen Austauschexperimenten betrug die initiale I_{sc} -Abnahme $0.41 \pm 0.17 \% \text{ sec}^{-1}$ ($n = 5$) des Novobiocin abhängigen I_{sc} , was einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 2.8 Min entspricht.

Abbildung 13 zeigt eine typische Dosis-Wirkungskurve für die Effekte von Novobiocin auf den Kurzschlußstrom I_{sc} bei *Rana esculenta*. Die Form der

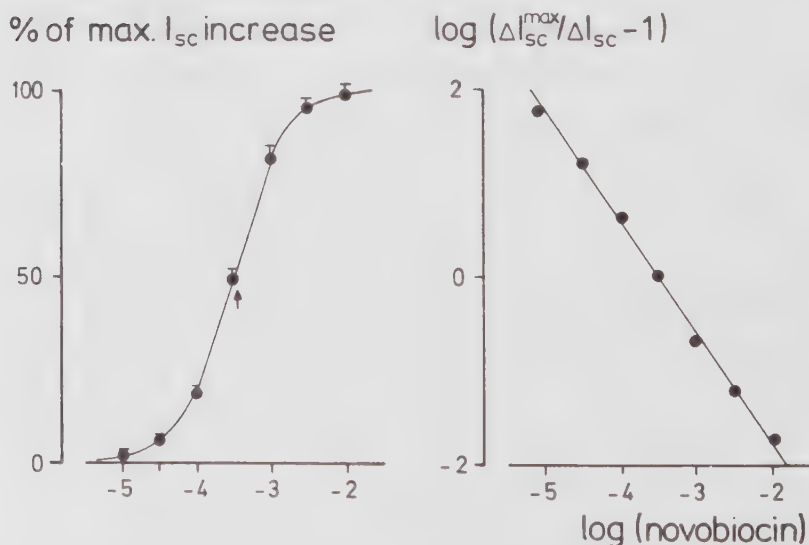


Abb. 13: Dosiswirkungskurve von Novobiocin (*Rana esculenta*). Die Mittelwerte $\pm$ SC errechnen sich aus 4 Stücken derselben Haut. 100 % entsprechen dem extrapolierten maximalen I_{sc} Anstieg ($\Delta I_{sc}^{\max}$). K_n ergibt 0.31 mM (Pfeil), der Hillkoeffizient beträgt 1.21.

Dosis-Wirkungskurve variierte trotz beträchtlicher Streuung in der maximal erhaltenen Stimulation des I_{sc} nur leicht bei verschiedenen Fröschen. Im Mittel betrugen die Novobiocinkonzentrationen bei halbmaximalem Effekt, K_n , 0.31 ± 0.05 mM und der Hill-Koeffizient, bestimmt aus dem log-log-Graph, 1.19 ± 0.04 ($n = 5$). Bei der üblicherweise verwendeten Novobiocinkonzentration von 1 mM wurden 84 ± 3 % der maximal möglichen Stimulation erreicht. In zwei Häuten war der I_{sc} -Wert von 10 mM Novobiocin geringfügig niedriger als bei 3.15 mM. Daraus läßt sich eine leicht hemmende Wirkung der Substanz bei sehr hohen Konzentrationen vermuten. Bei *Rana temporaria* wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht vollständig ermittelt. Bei zwei Häuten, bei denen zusätzlich auch Novobiocinkonzentrationen von 0.1 mM, 1 mM und 10 mM gegeben wurden, wurde die Maximalwirkung immer bei 1 mM beobachtet.

Die Wirkung von Novobiocin ist stark von der Natriumkonzentration des Außenbades, $(Na^+)_{\text{o}}$, abhängig. Wurde Natrium teilweise durch TRIS oder Kalium ersetzt, waren sowohl die absolute als auch die relative Stimulation des I_{sc} deutlich vermindert. Mit 1 mM $(Na^+)_{\text{o}}$ konnte durch Novobiocin (1 mM) manchmal eine leichte Hemmung des I_{sc} hervorgerufen werden. Die Abhängigkeit des Kurzschlußstroms von der Natriumkonzentration $(Na^+)_{\text{o}}$ zeigte große Unterschiede, wie in Abbildung 14 für zwei verschiedene Experimente dargestellt ist. In allen Häuten rief Novobiocin eine Zunahme von K_{Na} , d.h. der Natriumkonzentration $(Na^+)_{\text{o}}$, bei der der Strom halbmaximal wurde, hervor. Im Mittel stieg K_{Na} von 4.6 ± 0.7 mM unter Kontrollbedingungen auf 7.5 ± 12.0 mM nach Novobiocin ($n = 6$) an.

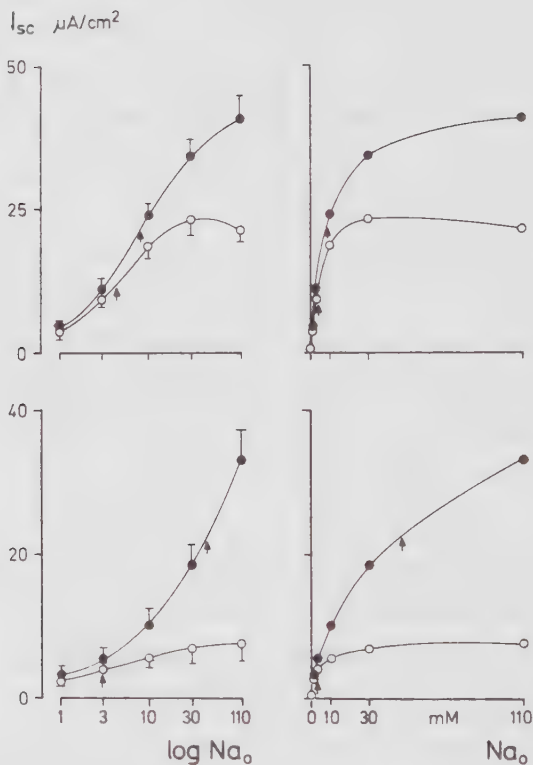


Abb. 14: Abhängigkeit des I_{sc} von der Na-Konzentration im Außenbad, $(Na)_o$, bei Zugabe von Novobiocin (1 mM) (gefüllte Kreise) oder unter Kontrollbedingungen (offene Kreise). Natrium wurde durch TRIS ersetzt, die innere Badelösung war normaler Ringer. Die K_{Na} -Werte, gekennzeichnet durch Pfeile, sind 4.2 und 8.4 mM für die Haut im oberen Bereich und 2.9 und 47 mM für die Haut im unteren Bereich. Die maximalen I_{sc} -Werte wurden aus linearen Plots bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus 4 Hautstücken.

In Abbildung 15 ist ein Experiment wiedergegeben, in dem Novobiocin bei $1 \text{ mM } (\text{Na}^+)_o$ hinzugefügt wurde, was nur eine kleine Stimulation des I_{sc} hervorrief (untere Kurve). Nach einem raschen Badewechsel mit normaler Ringerlösung ($(\text{Na}^+)_o = 110 \text{ mM}$), war sofort der volle stimulierende Effekt der Substanz vorhanden. Verglichen mit der I_{sc} -Reaktion, beobachtet in Abwesenheit von Novobiocin (obere Kurve), ist der initiale I_{sc} -Anstieg leicht erhöht und der Strom geht direkt auf Werte zurück, die viel höher sind als die Kontroll- I_{sc} -Werte. Nach dem Auswasch von Novobiocin kehrt I_{sc} zu Kontrollwerten zurück, während g_t vorübergehend weiter erhöht bleibt; noch 90 Min nach Beginn des Auswasches war der Anstieg nicht vollständig zurückgegangen (nicht abgebildet).

In einigen der oben erwähnten Experimente war ein Kurzschlußstrom (I_{sc}) ungleich Null selbst nach vollständigem Austausch von Natrium ($\text{Na}^+)_o$ gegen Kalium zu bemerken (*Rana esculenta*). Diese Stromkomponente zeigte keine Empfindlichkeit gegen Amilorid (0.3 mM) und verschwand auch nicht, wenn Cl^- in den Badelösungen gegen SO_4^{2-} eingetauscht wurde. Andererseits konnte der I_{sc} auf Werte nahe Null reduziert werden, wenn bei derselben Haut TRIS anstatt K^+ verwendet wurde, um Na^+ zu ersetzen. Zugabe von Ba^{2+} (20 mM) führte meistens zu einer vollständigen Hemmung des I_{sc} und zu einer geringfügigen weiteren Abnahme der Leitfähigkeit g_t , während TEA (20 mM) keine Wirkung hatte. Der anscheinend Ba^{2+} sensitive K^+ -Einstrom war auch bei einem Hautstück nachweisbar, das vorher nicht Novobiocin ausgesetzt war, so daß der Einstrom nicht notwendigerweise durch die Substanz hervorgerufen wurde.

Der Effekt von Novobiocin zeigt eine kritische Abhängigkeit vom pH der äußeren Badelösung, pH_o . In Abbildung 16 ist ein Experiment gezeigt, bei

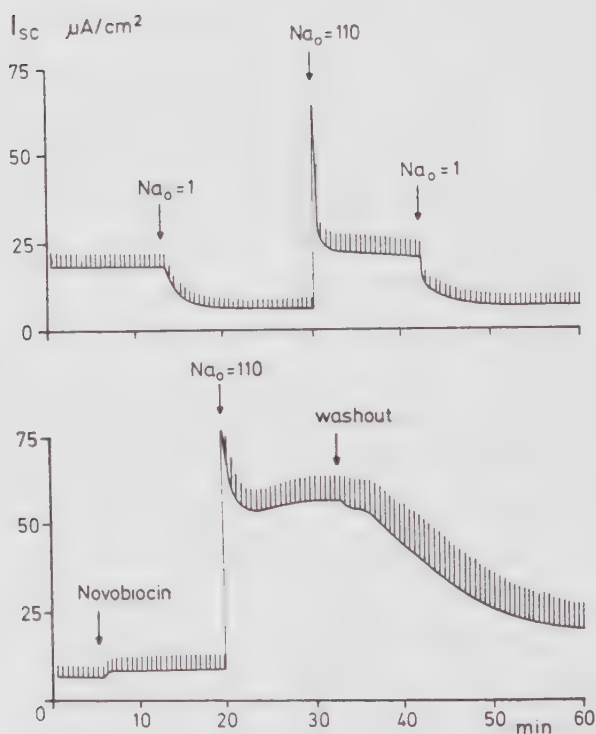


Abb. 15: Effekt von Novobiocin auf die Na^+ -Selbsthemmung des I_{sc} (*Rana esculenta*). Bei $(Na^+)_o = 1$ wurde das äußere Bad durch TRIS-Ringerlösung, die 1 mM Na enthielt ersetzt, bei $(Na^+)_o = 110$ wurde das Außenbad rasch zu normaler Ringerlösung zurückgetauscht. Die untere Kurve zeigt die Wirkung desselben Verfahrens in Anwesenheit von 1 mM Novobiocin.

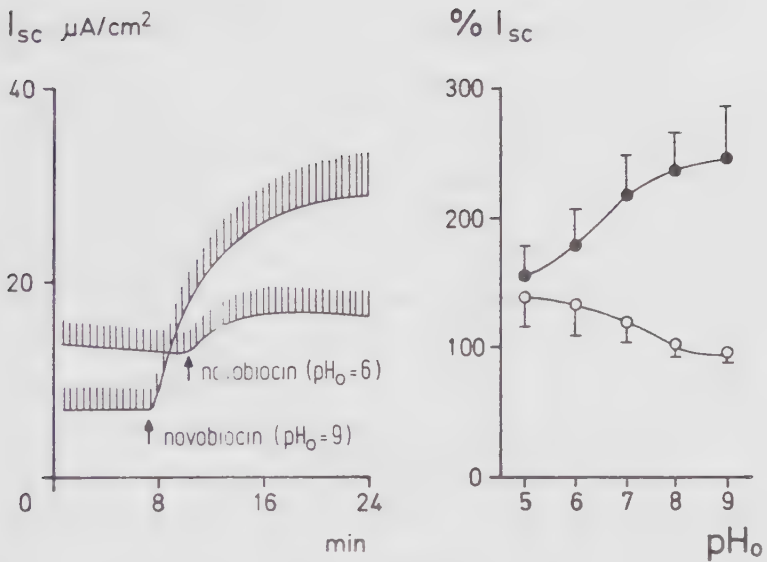


Abb. 16: Abhängigkeit des I_{sc} -Verhaltens unter Novobiocin vom pH der Außenlösung, pH_o . Auf der linken Seite ist der typische I_{sc} -Effekt von 1 mM Novobiocin bei zwei verschiedenen pH_o -Werten gezeigt. Auf der rechten Seite ist der I_{sc} vor (offene Kreise) und nach Zugabe (gefüllte Kreise) von Novobiocin als Funktion des pH_o aufgetragen. Die Mittelwerte $\pm$ SD wurden aus 4 Stücken derselben Haut (*Rana esculenta*) erhalten. pH_o wurde unter Verwendung von 3 mM Phosphatpuffer variiert. Die innere Badelösung war normale Ringerlösung. I_{sc} ist als % des Kontroll- I_{sc} angegeben, wie er mit normler Ringerlösung auf der Außenseite erhalten wurde.

dem pH_o zwischen 5 und 9 unter Verwendung von 3 mM Phosphatpuffer verändert wurde. Bei alkalischen pH sind sowohl die absolute als auch die relative Stimulation des I_{sc} weitaus stärker als bei saurem pH. Ein regelmäßiger Befund bei *Rana esculenta* war die leichte Stimulation des Kontroll- I_{sc} mit Abnahme des pH_o . Novobiocin, verwendet als das Natriumsalz

der Novobiocinsäure, ist bei niedrigem pH nur mäßig lösbar. Bei pH = 5 wurde etwa die Hälfte des hinzugefügten 1 mM Novobiocin ausgefällt.

Alle untersuchten Wirkungen von Novobiocin waren aufhebbar durch Amilorid. (Bei hohen Konzentrationen bilden Amilorid und Novobiocin einen unlöslichen Niederschlag. Das Löslichkeitsprodukt liegt allem Anschein nach bei etwa $3 \cdot 10^{-7} \text{ M}^2$.) In Anwesenheit von Amilorid (10^{-4} M) konnten keine Änderungen in I_{sc} , V_t , g_t oder R_t beobachtet werden. Gleichermäßen reduzierten sich I_{sc} und V_t auf nahe Null, wenn Amilorid nach Novobiocin zugegeben wurde (s. Abb. 11). Die g_t - und R_t -Werte unter dieser Bedingung waren mit jenen identisch, die sich mit Amilorid alleine ergaben, obwohl manchmal eine signifikant längere Zeit benötigt wurde, die g_t - und R_t -Änderungen zurückzunehmen, verglichen zu der Zeit, die zur vollständigen Hemmung des I_{sc} oder V_t gebraucht wurde (siehe z.B. die V_t -Kurve in Abb. 11). In Anwesenheit von Novobiocin schien die Affinität der Haut für Amilorid signifikant erhöht zu sein. Abbildung 17 zeigt die Wirkung von 1 mM Novobiocin auf die Amilorid-Hemmungskurve bei *Rana esculenta*. Die Inhibitionskonstante von Amilorid, K_a , wurde im Mittel von 1.72 ± 0.21 auf $0.49 \pm 0.047 \mu\text{M}$ erniedrigt, während der Hill-Koeffizient 0.81 ± 0.05 und 0.82 ± 0.07 ($n = 4$) in etwa unverändert blieb.

Die durch Novobiocin hervorgerufenen I_{sc} - und g_t -Änderungen sind gut miteinander korreliert. Nach Zugabe der Substanz wächst g_t linear mit dem I_{sc} an, wie in Abbildung 18 gezeigt ist. Im Gegensatz dazu war bei Häuten mit großem sekundären Leitfähigkeitsanstieg g_t , die Relation nicht linear (rechte Hälfte von Abb. 18). Durch die Abschätzung der treibenden Kraft des transepithelialen Natriumtransports, E_{Na} , aus der reziproken Steigung

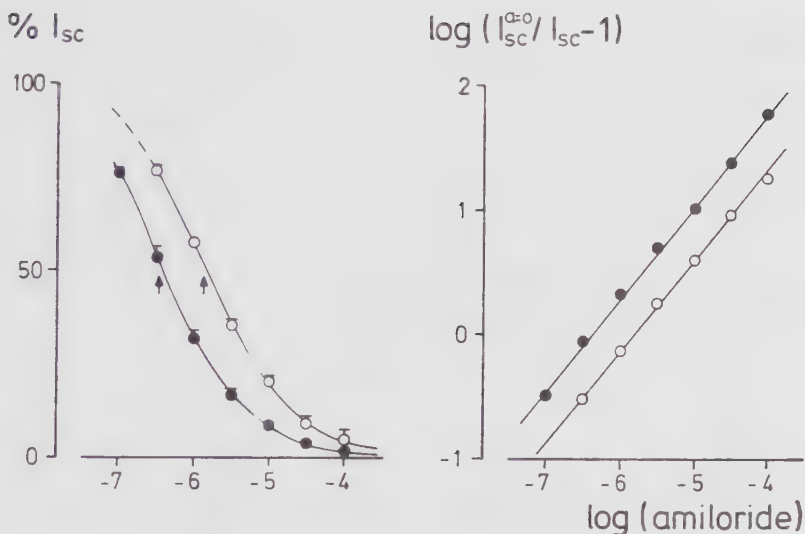


Abb. 17: Inhibitionskurve von Amilorid mit (gefüllte Kreise) oder ohne Novobiocin (1 mM) (offene Kreise) (*Rana esculenta*). I_{sc} ist angegeben als % des Wertes, beobachtet vor Amilorid ($I_{sc}^{a=0}$), welcher für die Kontrolle durchschnittlich $14.0 \pm 6.7 \mu A/cm^2$ und für Novobiocin $52.4 \pm 3.9 \mu A/cm^2$ betrug. Die Punkte sind Mittelwerte $\pm$ SD von 4 Stücken derselben Haut. Teilweise ist SD kleiner als die Größe der Symbole. Die K_a -Werte, angezeigt durch Pfeile, sind $0.40 \mu M$ in der Kontrolle und $1.41 \mu M$ nach Novobiocin. Der Hillkoeffizient bleibt ungeändert 0.74.

der initialen linearen Phase der Funktion (Yonath & Civan, 1971) konnte ein Mittelwert von 139 ± 31 mV ($n = 37$) errechnet werden. Die "shunt"-Leitfähigkeit, g_{sh} , die bei Gleichgewichtswerten von g_t nach Gabe von Amilorid gemessen wurde, war durch Novobiocin ungeändert und lag immer unterhalb

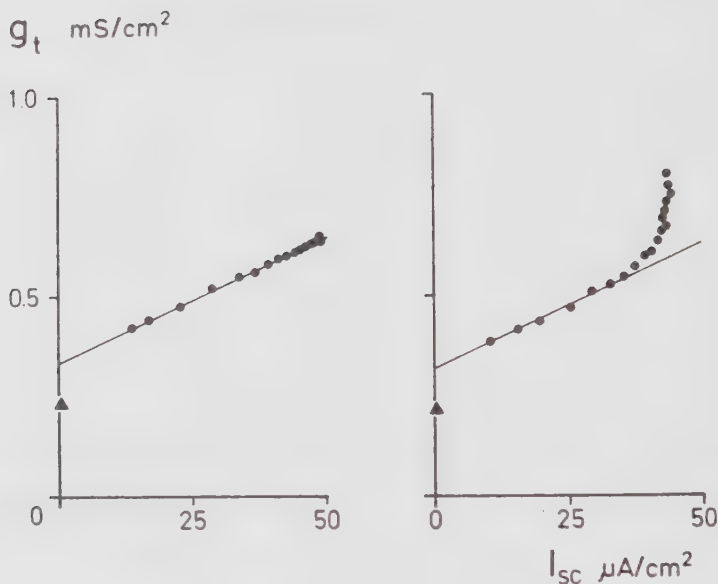


Abb. 18: Korrelation zwischen den initialen g_t und I_{sc} Änderungen, hervorgerufen durch 1 mM Novobiocin (*Rana esculenta*). Die Kurven wurden durch zwei Stücke derselben Haut erhalten; die rechte Haut zeigt einen deutlichen sekundären g_t Anstieg. Die Dreiecke bezeichnen die g_{sh} -Werte, die nach späterer Zugabe von Amilorid (0.1 mM) beobachtet wurden. In beiden Hautstücken beträgt E_{Na} , bestimmt aus der universen Steigung der Regressionsgeraden, 160 mV.

des Schnittpunkts der errechneten Regressionsgeraden mit der g_t -Achse. Die Mittelwerte von g_{sh} - und g_t -Abschnitt waren 0.251 ± 0.112 bzw. $0.292 \pm 0.182 \text{ mS/cm}^2$ ($n = 22$).

Eine enge Korrelation wurde auch zwischen den Gleichgewichtswerten von g_t und I_{sc} beobachtet. In Abbildung 19 ist die transzelluläre Leitfähigkeit

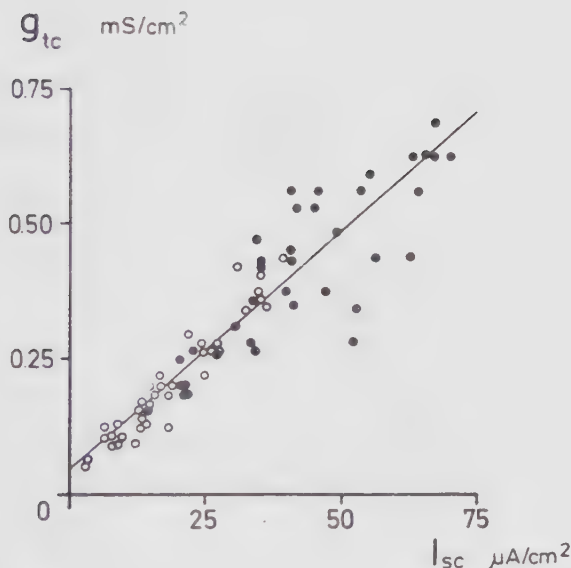


Abb. 19: Korrelation zwischen Gleichgewichtswerten von $g_{tc} = (g_t - g_{sh})$ und I_{sc} vor (offene Kreise) und nach Zugabe von 1 mM Novobiocin (gefüllte Kreise). Die Daten sind von 38 Häuten erhalten (*Rana esculenta*), ausschließlich 5 Häute mit sekundärem g_t Anstieg.

g_{tc} , berechnet aus der Substraktion der "shunt"-Leitfähigkeit g_{sh} von g_t , gegen I_{sc} aufgetragen. In Abwesenheit (offene Kreise) wie in Anwesenheit von Novobiocin (gefüllte Kreise) sind die g_{tc} -Werte linear abhängig vom I_{sc} . Die linearen Regressionskurven, separat berechnet für Kontroll- und Novobiocindaten, sind nicht signifikant unterschiedlich. Die gemeinsame Regressionsgerade besitzt eine Steigung von 117 mV und einen g_{tc} -Abschnitt von 0.51 mS/cm². Die mittlere Steilheit der Verbindungslinien der

jeweils individuellen Kontroll- und Novobiocinwerte liegt leicht höher bei $129 \pm 43 \text{ mV}$ ($n = 38$).

Abbildung 20 illustriert die typischen Effekte von Novobiocin auf die IV-Beziehung (selbe Haut wie bei Abbildung 18). In Abwesenheit von

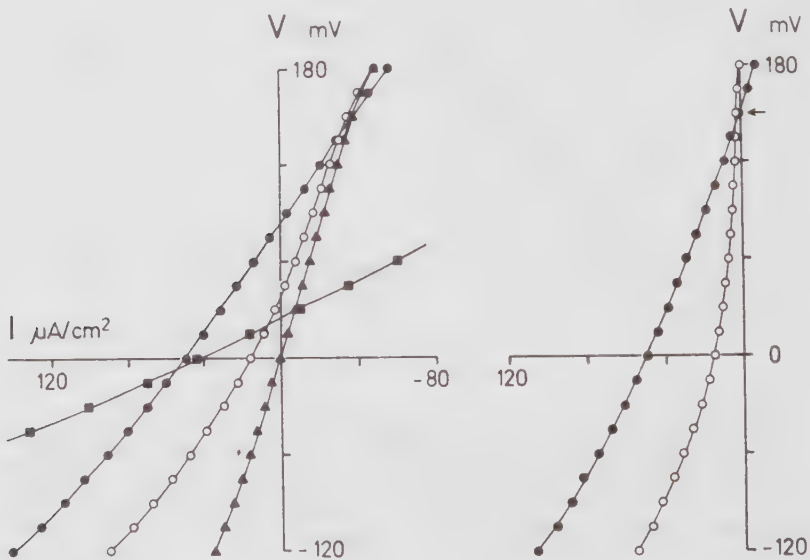


Abb. 20: Wirkung von Novobiocin auf die transepitheliale IV-Kurve (*Rana esculenta*). Offene Kreise bezeichnen Kontrollwerte, geschlossene Kreise Novobiocinwerte (1 mM). Dreiecke geben Werte mit Novobiocin und nachfolgend Amilorid (0.1 mM) an, exakt die identische Kurve wurde mit Amilorid ohne vorausgehende Gabe von Novobiocin beobachtet. Quadratische Symbole stehen für Hautstücke mit sekundären g_t -Anstieg. Die Kurven auf der rechten Seite sind für die Amilorid insensitive Stromkomponenten korrigierte. Der Ordinatenabschnitt (Pfeil) der Novobiocinkurve liegt bei 150 mV.

Amilorid ruft Novobiocin eine auffallende Änderung in der Kurvenform hervor, die deutlicher sichtbar wird, wenn die Amilorid-insensitive Stromkomponente abgezogen wird (rechte Hälfte von Abb. 20). Novobiocin reduziert die Steigung der IV-Kurve, besonders die Zunahme der Steilheit, die bei hohen Werten von V auftritt. Darüber hinaus scheint Novobiocin den Schnittpunkt mit der V -Achse zu erniedrigen. Der durchschnittliche Achsenabschnitt nach Novobiocin war in der Größe von 141 ± 16 mV ($n = 8$).

In Kontrollhäuten konnte der Wert dieses Abschnitts nicht mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden, weil im hyperpolarisierenden Bereich die Amilorid- und Kontrollkurven beinahe parallel verliefen. Jedoch schien in den meisten Fällen der Schnittpunkt höher zu liegen. Eine nahezu lineare IV-Beziehung wurde in einem zweiten Stück derselben Haut beobachtet, welches einen großen sekundären Leitfähigkeitsanstieg g_t aufwies (Quadrate in Abbildung 20).

Der sekundäre Leitfähigkeitsanstieg g_t war nur mit Cl^- -haltigen Badelösungen beobachtbar. Von 12 in SO_4^{2-} -Ringerlösungen inkubierten Häuten trat bei keiner einzigen Haut ein sekundärer Leitfähigkeitsanstieg g_t auf, obwohl die I_{sc} -Wirkung von Novobiocin nicht verändert schien. In weiteren Experimenten wurden leicht niedrigere Werte des Ausgangs- I_{sc} und des Novobiocin stimulierten I_{sc} in SO_4^{2-} -Ringerlösungen gesehen, wohingegen die prozentuale Stimulation im allgemeinen höher war. Abbildung 21 zeigt ein Hautstück mit starkem sekundärem Leitfähigkeitsanstieg g_t während der Inkubierung in normaler Cl^- -haltiger Ringerlösung. Während der sekundären g_t -Zunahme geht der mit Novobiocin stimulierte I_{sc} etwa auf die Hälfte seines Maximalwertes zurück. Um die Natur dieses g_t -Zuwachses zu testen, wurde das Außenbad rasch gegen SO_4^{2-} -Ringer ($\text{Cl}_o^- = 0$) ausgetauscht. Dies führt zu einer fast augenblicklichen, sprunghaften Zunahme im I_{sc} und einem Absin-

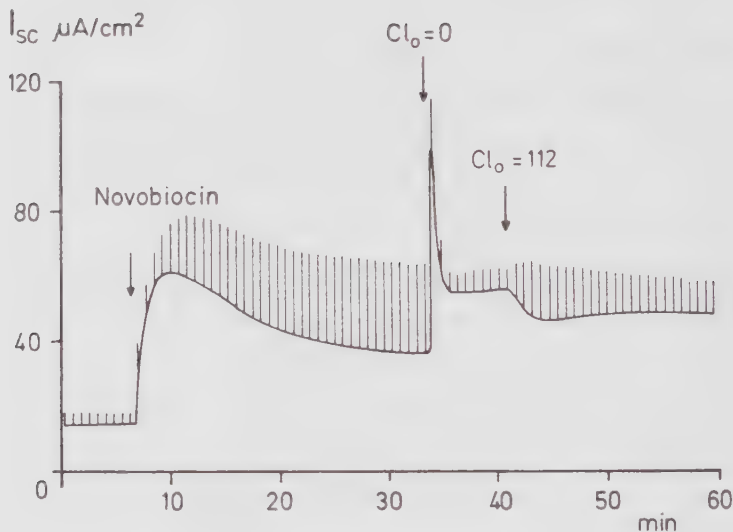


Abb. 21: Wirkung von Cl_0^- auf den sekundären Leitfähigkeitsanstieg g_t . Nach Zugabe von Novobiocin (1 mM) wurde das Außenbad rasch durch eine Cl^- -freie SO_4^{2-} -Ringerlösung ($Cl_0^- = 0$ mM) ausgetauscht. Dann wurde wieder zur ursprünglichen Perfusionsrate mit normaler Ringerlösung ($Cl_0^- = 112$ mM) übergegangen.

ken von g_t . Innerhalb von 2 Minuten erreicht I_{sc} einen neuen Gleichgewichtswert und g_t zeigt weiter eine signifikante Reduktion. Nach dem Übergang zu wieder Cl^- -haltiger Ringerlösung ($Cl_0^- = 112$ mM) erreicht I_{sc} Werte, die viel höher sind als vor der Cl^- -freien Inkubationsperiode, während die g_t -Werte stark erniedrigt sind. Tatsächlich scheint sich die Wegnahme der Bedingung, die dem sekundären Leitfähigkeitsanstieg g_t zugrundeliegt, fortzusetzen, da trotz der Rückkehr zu normaler Ringerlösung der I_{sc} noch weiter ansteigt und g_t nach einer vorübergehenden Zunahme, weiter abfällt.

Inkubiert man Hautstücke, die keinen sekundären Leitfähigkeitsanstieg g_t aufweisen, in Cl^- -freier Ringerlösung, können ähnliche Reaktionen beobachtet werden. Der Umfang der Änderungen ist aber um den Faktor 5 - 10 geringer und I_{sc} - und g_t -Werte vor und nach der Inkubation sind nicht deutlich unterschiedlich.

Abbildung 22 zeigt die Wirkung des Ca^{2+} -Antagonisten Diltiazem, der zum Außenbad (1 mM) hinzugefügt wurde. Ähnlich wie bei Novobiocin ist ein schnelles Ansteigen in I_{sc} und g_t zu sehen. Im Unterschied zu Novobiocin wird die Wirkung nicht aufrechterhalten und schon vor dem Auswasch der

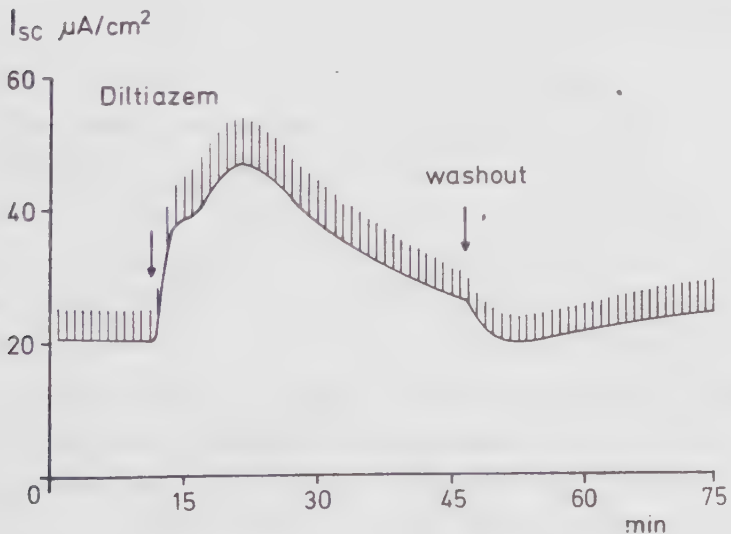


Abb. 22: I_{sc} -Antwort auf Diltiazem (1 mM), das zum Außenbad hinzugefügt wurde (*Rana esculenta*).

Substanz sind die I_{sc} - und g_t -Änderungen nahezu zurückgegangen. Bei wiederholter Zugabe von Diltiazem ist seine Stimulation deutlich vermindert. Die Wirkung von Novobiocin auf die Froschhaut wurde bei einer vorausgehenden Gabe von Diltiazem gehemmt, während vorher gegebenes Novobiocin den Effekt von Diltiazem nicht behindert. Die maximale Stimulation des I_{sc} durch Diltiazem war, verglichen mit Novobiocin, bei Häuten von *Rana esculenta* immer niedriger. Die Wirkung bei *Rana temporaria* war etwa dieselbe oder noch größer. Die Diltiazemstimulation von I_{sc} war vollständig durch Amilorid hemmbar. Bei Zugabe zum Innenbad konnte im allgemeinen eine geringfügige Hemmung des I_{sc} beobachtet werden.

4.2 Untersuchungen mit Mikroelektroden

Das typische Verhalten von zellulärem Potential (U_o), fraktionellem Widerstand ($f(R_o)$), Kurzschlußstrom (I_{sc}) und transepithelialer Leitfähigkeit (g_t) einer isolierten Haut (*Rana esculenta*) bei Zugabe von 1 mM Novobiocin zum epithelialen Bad ist in Abbildung 23 dargestellt. Innerhalb von 2 Minuten depolarisierte U_o von -98 mV auf -41.5 mV, gleichzeitig sank $f(R_o)$ von 0.95 auf 0.56 ab. Nach Hinzugabe von Amilorid (10^{-4} M) stieg das Potential sehr rasch (0.2 Min, $n = 16$) auf -120 mV und $f(R_o)$ auf Werte nahe 1.0, wie unter Amilorid ohne Novobiocin zu erwarten, an. Auswasch von Amilorid durch Novobiocin (1 mM) führte erneut zu einer Depolarisation (-60 mV). Novobiocin nach Amilorid zeigte eine stark verzögerte und nicht so deutlich ausgeprägte Wirkung auf alle Parameter (U_o , $f(R_o)$, I_{sc} , g_t). Dieses Verhalten liegt an den zu langsamen Auswaschbedingungen der Punktionskammer. Bei längerem Amiloridaus- und Novobiocineinwasch kann dieselbe Novobiocinwirkung erreicht werden. Novobiocinauswasch durch

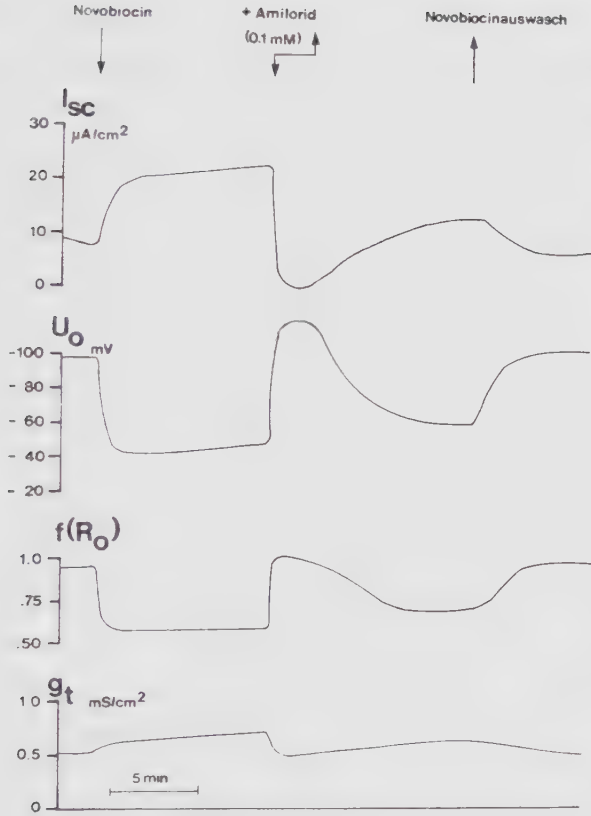


Abb. 23: Wirkung von Novobiocin (1 mM) und Amilorid (0.1 mM) auf I_{sc} , U_o , $f(R_o)$ und g_t der Bauchhaut von *Rana esculenta*.

normale Froschringerlösung führt U_o und $f(R_o)$ wieder annähernd auf Kontrollwerte (-94 mV, 0.98) zurück. Beim I_{sc} bewirkt Novobiocin mehr als eine Verdoppelung des Ausgangswertes. Die Leitfähigkeit über die Membran g_t steigt kontinuierlich während der Novobiocinzugabe an.

In Abbildung 24 war dasselbe Versuchsprotokoll durchgeführt worden, jedoch zeigte diese Haut einen starken sekundären Leitfähigkeitsanstieg (g_t). Innerhalb einer Minute nach Gabe von Amilorid (10^{-4} M) zur Novobiocinlösung

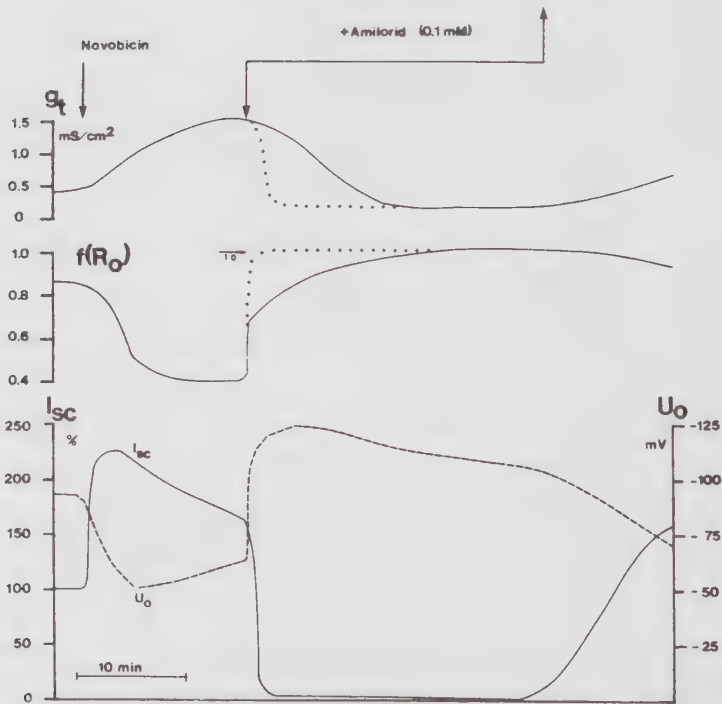


Abb. 24: Identisches Versuchsprotokoll wie bei Abb. 23. Diese Haut zeigt einen deutlichen sekundären Leitfähigkeitsanstieg g_t . Unter Amilorid (0.1 mM) nimmt g_t nur langsam ab, parallel dazu steigt $f(R_o)$ auf Werte nahe 1.0. Die gepunktete Linie gibt den zu erwartenden Verlauf von g_t und $f(R_o)$ ohne sekundäre Leitfähigkeitszunahme an.

reduzierte sich I_{sc} auf Werte nahe Null und das Potential U_o hyperpolarisierte auf -125 mV. Die Abbildung zeigt deutlich, daß der sekundäre Leitfähigkeitsanstieg g_t erst nach mehr als 10 Minuten Amiloridzugabe (0.1 mM) abgebaut wurde, obwohl I_{sc} und U_o längst Amiloridwerte erreicht hatten. Parallel zur Abnahme von g_t stieg der fraktionelle Widerstand $f(R_o)$ langsam auf Werte nahe 1.0 , wie sie unter Amilorid - sowohl mit als auch ohne Novobiocin - zu erwarten wären. Während der gesamten Amiloridphase (> 20 Min) triftet U_o leicht ab (-110 mV).

Tabelle 4 faßt die Effekte von Novobiocin auf I_{sc} , U_o , g_t , $f(R_o)$ und auf die errechneten Werte P_{Na} , dg_{Na} und g_o zusammen. Diese Daten wurden aus den Punktionsversuchen erhalten. Die mittlere Potentialänderung U_o beträgt 44.34 ± 17.60 mV, die Permeabilitätszunahme P_{Na} im Mittel 481.9 ± 306.1 %, $f(R_o)$ fällt von 0.88 auf 0.55 ab. Die Wirkung von Novobiocin auf I_{sc} und g_t entspricht den Werten aus Tabelle 3. Deutlich ist die Übereinstimmung zwischen dg_{Na} und g_o zu erkennen, die auf zwei unabhängige Weisen bestimmt wurden.

In Abbildung 25 ist die Abhängigkeit des Stroms I_{sc} von der Permeabilität P_{Na} dargestellt. Diese Abhängigkeit kann in erster Näherung durch eine Michaelis-Menten-Kinetik

$$I_{sc} = I_{Max} \cdot \frac{P_{Na}}{K_M + P_{Na}} \quad (39)$$

beschrieben werden, mit $I_{Max} = 64.72$ μ A/sec und $K_M = 14.5$ nm/sec. Dies bedeutet, daß die Kinetik des Natriumeinstroms durch ein chemisches Reaktionsverhalten dargestellt werden kann. Dieses Verhalten läßt sich derart

	I_{sc} $\mu A/cm^2$	U_o mV	g_t mS/cm ²	$f(R_o)$ —	P_{Na} nm/sec	dq_{Na} mS/cm ²	g_o mS/cm ²
Kontrolle	18.35 ± 11.70	77.93 ± 16.52	0.513 ± 0.178	0.878 ± 0.064	5.64 ± 3.68	0.211 ± 0.136	0.262 ± 0.161
Novoblocln	44.53 ± 18.53	32.37 ± 22.19	0.943 ± 0.412	0.553 ± 0.191	31.42 ± 21.66	0.936 ± 0.538	0.912 ± 0.520

n = 33

Tabelle 4: Wirkung von Novoblocln (1 mM) auf Kurzschlußstrom I_{sc} , zelluläres Potential U_o , transepitheliale Leitfähigkeit g_t , fraktionellen Widerstand $f(R_o)$, apikale Natriumpermeeblität P_{Na} "slope"-Leitfähigkeit dq_{Na} und Leitfähigkeit der äußeren Membran g_o (Mittelwerte ± SD (Anzahl der Häute)). Es sind jeweils die Werte maximaler Depolarisation von U_o angegeben. Dauerte die Depolarisationszunahme über den Zeitraum von 10 min hinaus an, wurde dieser 10-Minutenwert verwendet. Alle Daten wurden mit der Haut von *Rana esculenta* erhalten.

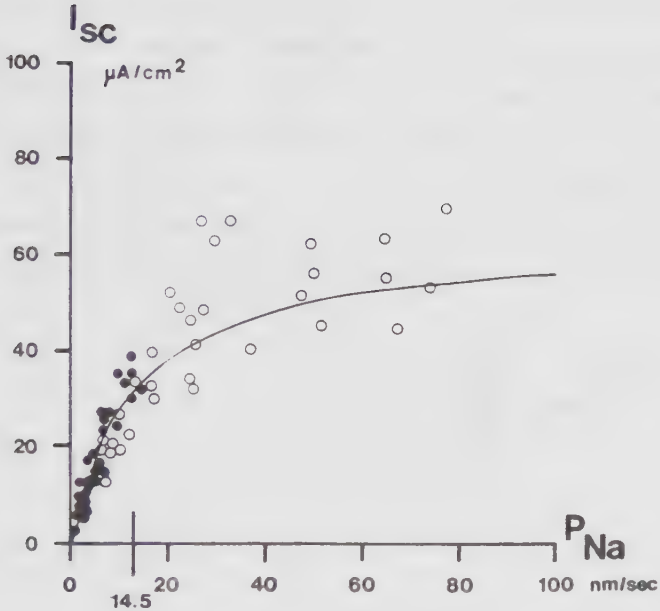


Abb. 25: Abhängigkeit des Stroms I_{sc} von der Permeabilität von Natrium P_{Na} an der apikalen Membran. Die gefüllten Kreise geben Kontrollwerte, die offenen Kreise Novobiocinwerte wieder. $K_M = 14.5$ nm/sec ist die Permeabilität, die einen halbmaximalen I_{sc} bewirkt.

interpretieren, daß durch die Gabe von Novobiocin über die Membran kein neuer Transportmechanismus eröffnet wird. Novobiocin verschiebt vielmehr den Leistungsbereich der transportierenden Membran zu höheren Permeabilitäten. Das Sättigungsverhalten des I_{sc} ist schon durch Kontrollbedingungen (gefüllte Kreise) vorgegeben, da sich Kontroll- und Novobiocinwerte dem durch die Kinetik gegebenen Graphen bruchlos anpassen.

Abbildung 26 stellt die relative I_{sc} -Stimulation, logarithmisch gegen die Kontrollwerte des fraktionellen Widerstandes aufgetragen, dar. Es läßt sich erkennen, daß bei kleinen Werten von $f(R_o)$ nur eine geringe Transportstimulation erfolgte. Legt man als Regressionsrelation die Hyperbelfunktion $y = ax^b$ (mit $y = \log I_{sc} \text{ (Novo.)} - \log I_{sc} \text{ (Kontr.)}$ und $x = 1 - f(R_o)$) zugrunde, ergeben sich für $a = 0.1753$, $b = -0.3260$ und für die Regressionskonstante $r = 0.62$. Daraus ergibt sich für $f(R_o) \longrightarrow 1.0$ eine unendlich

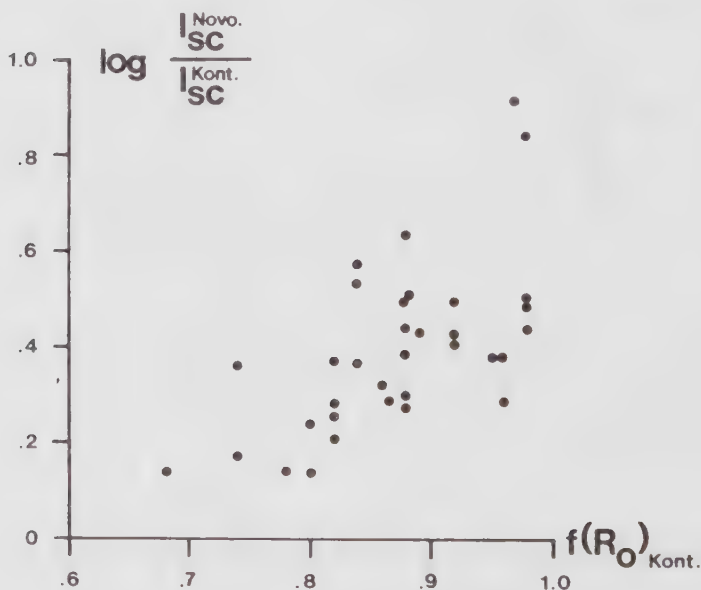


Abb. 26: Relative I_{sc} -Stimulation, logarithmisch gegen Kontrollwerte des fraktionellen Widerstandes aufgetragen. Die Hyperbelfunktion $y = ax^b$, mit $x = 1 - f(R_o)$ und $y = \log I_{sc} \text{ (Novo.)} - \log I_{sc} \text{ (Kontr.)}$, als Regressionsrelation ergibt mit $a = 0.1753$ und $b = -0.3260$ eine Regressionskonstante $r = 0.62$.

große Stimulation, für $f(R_0) \rightarrow 0$ nähert sich die Funktion dem konstanten Wert $a = 0.1753$. Trägt man dagegen den Kurzschlußstrom I_{sc} als Funktion des zugehörigen $f(R_0)$ auf (Abb. 27), die offenen Kreise geben Kontrollwerte, gefüllte Kreise die Werte unter Novobiocin wieder, zeigt sich ein kontinuierlicher Übergang der beiden Bedingungen. Aus Abbildung 27 ist weiter zu erkennen, daß bei sehr großen Werten von $f(R_0)$ der zugehörige Kurzschlußstrom sehr gering war, was für eine gute Selbsthemmung der

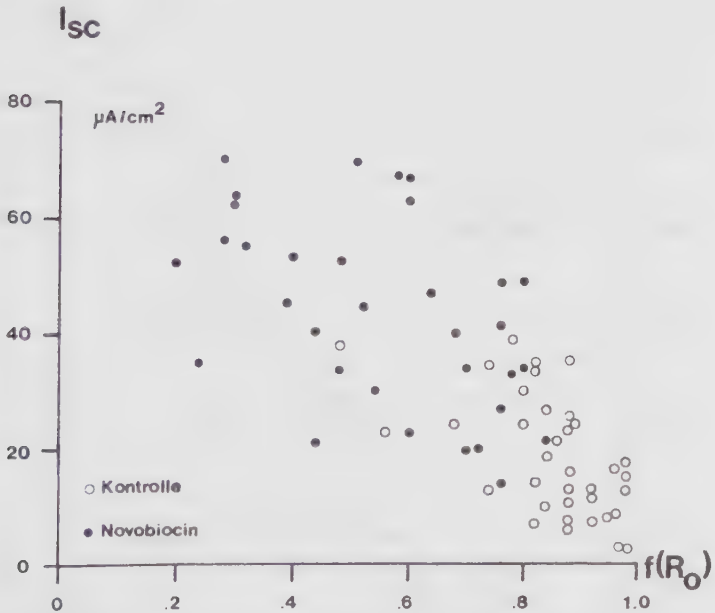


Abb. 27: I_{sc} als Funktion des zugehörigen $f(R_0)$. Offene Kreise stehen für Kontrollwerte, gefüllte Kreise für Novobiocinwerte. Deutlich ist der kontinuierliche Übergang der beiden Bedingungen. Für kleine $f(R_0)$ scheint sich ein konstanter I_{sc} im Bereich zwischen 70 und 90 $\mu A/cm^2$ anzudeuten.

Haut spricht, während sich für sehr kleine fraktionelle Widerstände ein maximaler Sättigungsstrom von $70 - 90 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ andeutet. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem in Abb. 25 dargestellten Ergebnis.

Abbildung 28 gibt den Zusammenhang von fraktionellem Widerstand $f(R_o)$ und intrazellulärem Potential U_o wieder. Unter der Voraussetzung, daß sich die zelluläre Natriumkonzentration $(\text{Na}^+)_i$ nicht ändert, wäre theoretisch eine Gerade zu erwarten, bei der U_o für $f(R_o) \rightarrow 1.0$ dem Kaliumgleichgewichtspotential, $E_K \approx -90 \text{ mV}$, und für $f(R_o) \rightarrow 0$ dem Natriumgleich-

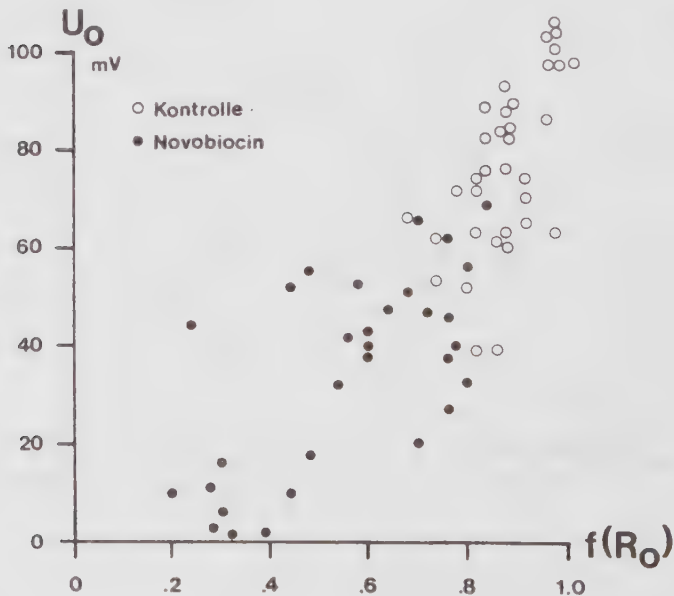


Abb. 28: Abhängigkeit des zellulären Potentials U_o vom fraktionellen Widerstand $f(R_o)$. Kontrollbedingung (offene Kreise) und Novobiocinwerte (gefüllte Kreise) gehen ineinanderüber.

gewichtspotential $E'_{Na} \approx 60$ mV entspricht. Die Kontrollwerte von U_o (offene Kreise) mit hohem $f(R_o)$ stimmten annähernd mit der theoretischen Erwartung überein. Bei den Novobiocinwerten (gefüllte Kreise) läßt sich ein Abknicken von der theoretischen Geraden beobachten, was durch die zunehmende Natriumkonzentration $(Na^+)_i$ zu erklären ist.

Über die Bestimmung des Potentials U_o und des fraktionellen Widerstandes wurde die Leitfähigkeit der apikalen Membran auf zwei verschiedene Weisen berechnet: über den Kurzschlußstrom I_{sc} , das Potential U_o , $(Na^+)_o$ und $(Na^+)_i$, die sog. "slope-conductance" dg_{Na} und über den fraktionellen Widerstand $f(R_o)$ die Ohm'sche Leitfähigkeit g_o . Wie aus Abb. 29 hervorgeht, stimmen diese Werte sowohl unter Kontrollbedingungen (a) ($y = 1.011x + 0.028$; $r = 0.99$; $n = 27$) als auch unter Novobiocin (b) ($y = 0.925x + 0.45$; $r = 0.96$; $n = 31$) sehr gut überein.

Neben Punktionsversuchen unter kurzgeschlossenen Bedingungen wurden auch 3 Versuche unter offenen Bedingungen durchgeführt. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Abb. 30 gibt einen typischen Verlauf dieses Versuchsprotokolls (Versuch (c)) wieder. Die Versuchsdurchführungen und der Versuchsteil unter Kurzschlußbedingung sind identisch mit Abb. 23. Durch den Übergang von kurzgeschlossenen zu offenen Bedingungen macht U_o einen Sprung von -103 mV auf -85 mV. Unter Novobiocin depolarisiert U_o auf -35.5 mV (Vgl. bei kurzgeschlossener Bedingung nahm U_o von -98 mV auf -41.5 mV ab). Im fraktionellen Widerstand $f(R_o)$ ist bei diesem Versuch kein auffallender Unterschied zu erkennen. Das Gleiche gilt für dg_{Na} und P_{Na} (Tabelle 5), die im Falle der offenen Bedingung mit Hilfe von I_{sh} bestimmt wurden, der aus V_t und g_{sh} (bestimmt aus der

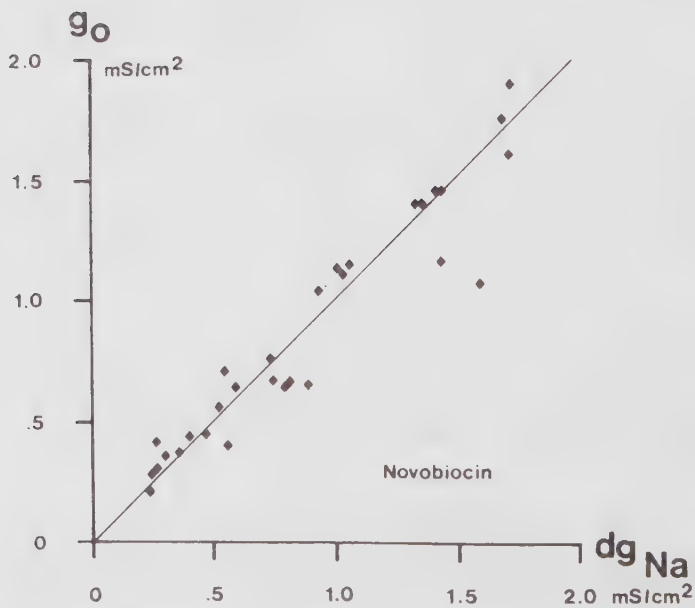
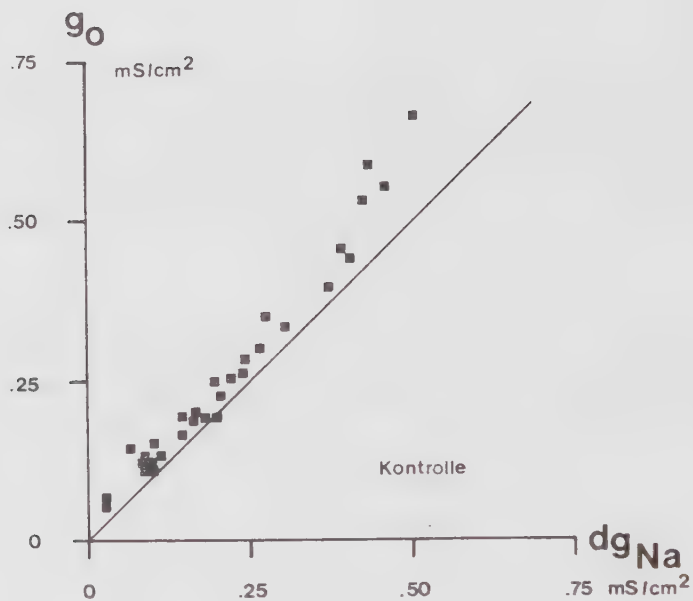


Abb. 29: Übereinstimmung zwischen der Ohm'schen Leitfähigkeit g_O und der "slope"-Leitfähigkeit dg_{Na} , (a) für Kontrollbedingungen (b) unter Novobiocin.

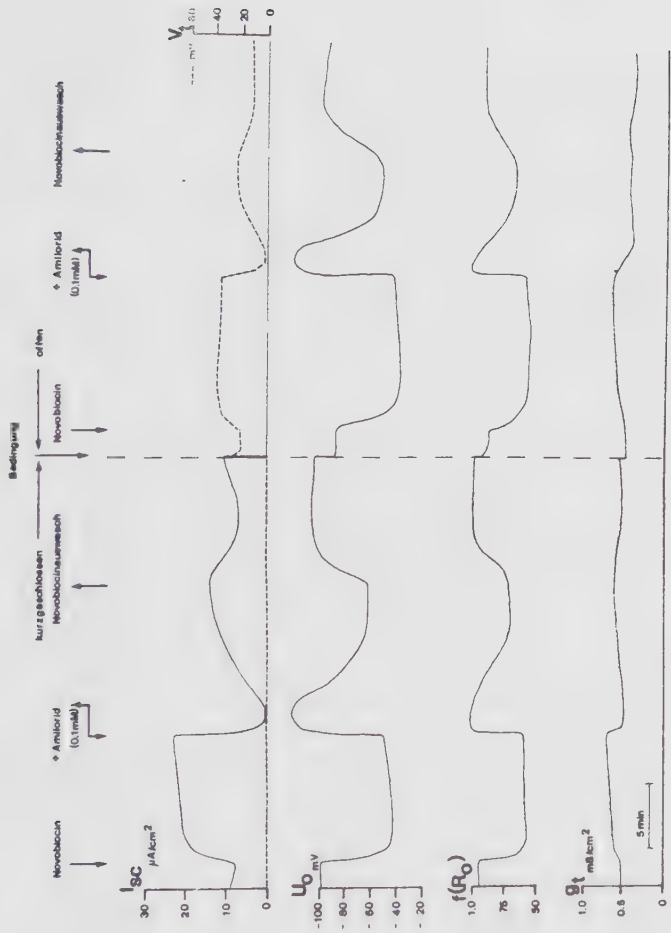


Abb. 30: Wirkung von Novobiocin (1 mM) und Amilorid auf U_o , $f(R_o)$, g_t , I_{sc} und V_t unter kurzgeschlossener (links) und offener Bedingung (rechts). $V_t = 0$ unter Kurzschlußbedingung, $I_{sc} = 0$ unter offener Versuchsdurchführung.

Kurzgeschlossene			offene Bedingung		
Kontrolle	Novobiocin		Kontrolle	Novobiocin	
	(1)	(2)		(1)	(2)
I_{sc} ($\mu A/cm^2$)	a) 26.9	67.5	V_t (mV)	a) 48.2	94.1
	b) 24.4	33.8		b) 36.3	55.4
	c) 8.4	20.3		c) 21.5	37.3
R_t ($k\Omega \cdot cm^2$)	a) 1.51	0.75		a) 2.88	1.31
	b) 1.49	1.42		b) 1.76	1.41
	c) 1.91	1.43		c) 2.11	1.73
U_o (mV)	a) -103	-57.5		a) -82	-20
	b) - 63	-18		b) -53.5	-14
	c) - 98	-41.5		c) -85	-35.5
$t(R_o)$	a) 0.920	0.640		a) 0.960	0.636
	b) 0.800	0.550		b) 0.824	0.600
	c) 0.840	0.560		c) 0.848	0.555
dg_{Na}^2 (mS/cm^2)	a) 0.244	0.945		a) 0.160	0.683
	b) 0.307	0.720	(*)	b) 0.207	0.522
	c) 0.080	0.326		c) 0.095	0.304
P_{Na} (nm/sec)	a) 6.07	25.62		a) 1.05	6.95
	b) 8.45	24.81	(*)	b) 5.93	18.53
	c) 2.00	9.67		c) 2.43	8.91

Tabelle 5: Wirkung von Novobiocin unter kurzgeschlossenen und offenen Bedingungen bei drei Versuchen a, b, c (*Rana esculenta*). Die Werte von dg_{Na} und P_{Na} unter offenen Bedingungen (*) wurden mit Hilfe von I_{sh} (Strom durch den "shunt"), der aus V_t und g_{sh} ($I_{sh} = V_t \cdot g_{sh}$) bestimmt wurde, (Tabelle 6), errechnet. (1) = Werte bei maximaler Depolarisation (2) = Werte 5 Min. nach (1).

Kontrolle		Novobiocin	
		(1)	(2)
g_{sh} (mS/cm ²)	a) 0.31	0.35	1.00
	b) 0.42	0.42	0.42
	c) 0.43	0.51	0.51
I_{sh} (μ A/cm ²)	a) 14.9	32.9	57.0
	b) 15.1	23.1	23.1
	c) 9.0	17.8	17.8

Tabelle 6: "Shunt"-Leitfähigkeit g_{sh} und Strom I_{sh} durch den "shunt", bestimmt unter offenen Bedingungen. Die g_{sh} -Werte ergaben sich als die nicht durch Amilorid hemmbaren transepithelialen Leitfähigkeiten ohne (Kontrolle) bzw. mit Novobiocin. g_{sh} -Novobiocinwert (1) von Versuch a) wurde als Zwischenwert angenommen.

durch Amilorid nicht hemmbaren transepithelialen Leitfähigkeit) ($I_{sh} = V_t \cdot g_{sh}$) berechnet wurde (Tabelle 6).

5. DISKUSSION

Das Antibiotikum Novobiocin gehört zu einer Gruppe pharmakologisch äußerst unterschiedlicher Substanzen, von denen bekannt ist, daß sie, zum Außenbad zugegeben, den aktiven transepithelialen Na^+ -Transport der Froschhaut oder anderer Epithelien stimulieren. Zu diesen "external agents" (de Sousa, 1979) gehören Atropin, Pilocarpin, Histamin und d-Tubocurarin (Kirschner, 1955), Procain und andere Lokalanästhetika (Skou & Zerahn, 1959), einige Schleifendiuretika (Fülgraff et al., 1973; Kramer, 1976; Dörge & Nagel, 1980; Dörge et al., 1983), Amilorid und seine Analoge (Garcia-Romeu, 1974; Zeiske & Lindemann, 1974; Li & de Sousa, 1979; Li & Lindemann, 1983a), Diphenylhydantoin (de Sousa & Grosso, 1973; Riddle et al., 1975), psychotrope Pharmaka (Grosso & de Sousa, 1978) SH-Gruppen blockierende Stoffe (Janaček, 1962; Li & Lindemann, 1983a), Phentolamin und Propanolol (Garcia-Romeu, 1974; Li & de Sousa, 1979), ebenso wie mehrwertige anorganische Kationen (de Sousa et al., 1973; Grinstein et al., 1978). Alle diese Substanzen haben gemeinsam, daß sie nur bei relativ hohen Konzentrationen, gewöhnlich im Millimolarbereich, wirken. Bei Zugabe zum Innenbad kann oft kein oder ein hemmender Effekt auf den Natriumtransport beobachtet werden (Skou & Zerahn, 1959; Johnston & Hoshiko, 1971; de Sousa & Grosso, 1973; de Sousa et al., 1973; Fülgraff et al., 1973; Garcia-Romeu, 1974; Dörge et al., 1983). Die stimulierende Wirkung konnte vollständig durch Amilorid inhibiert werden (Fülgraff et al., 1973; de Sousa et al., 1973; Zeiske & Lindemann, 1974; Li & de Sousa, 1979; Dörge et al., 1983) und war additiv zur cAMP-vermittelten Stimulation natripherischer Hormone, die von der Innenseite wirken (Li & de Sousa, 1979; de Sousa & Grosso, 1973). Zwischen einigen der "external agents" konnte eine

gegenseitige Hemmung beobachtet werden (Li & de Sousa, 1979), was auf einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus hinweist.

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein auffallender Unterschied in der Empfindlichkeit für Novobiocin zwischen den beiden Froscharten deutlich. Sowohl die relative als auch die absolute Stimulation des Natriumtransports, gemessen als I_{sc} , waren bei *Rana esculenta* weitaus ausgeprägter als bei *Rana temporaria*. Ähnliches beobachtete Kirschner (1955) bei Atropin und Curare, die zwar bei Häuten von *Rana esculenta* wirksam sind, aber bei Häuten von *Rana temporaria* keinen Effekt zeigen. Dieselben artspezifischen Unterschiede wurden für Procain festgestellt (Skou & Zerahn, 1959). Johnston und Hoshiko (1971) berichteten, daß Novobiocin den Natriumtransport in der Haut von *Rana pipiens* erhöht, nicht aber in der Blase von *Bufo marinus* oder *Rana catesbeiana*. Während der Untersuchungen wurde auch eine jahreszeitliche Variabilität festgestellt. So zeigten Sommerfrösche nur eine relativ niedrige Steigerung im I_{sc} .

Skou und Zerahn (1959) kamen zu der Ansicht, daß die Lokalanästhetika direkt mit der apikalen Membran von Epithelzellen interagieren, da sie ihre stimulierende Wirkung nur von der Außenseite zeigen und vermutlich nicht in die Zellen eindringen. Dasselbe gilt wahrscheinlich auch für Novobiocin. Zudem muß angenommen werden, daß Novobiocin ausschließlich auf die Amilorid-sensitiven Natriumkanäle, die in den apikalen Membranen vorhanden sind, wirkt. War Amilorid im Außenbad vorhanden, zeigte Novobiocin keinerlei Effekte auf I_{sc} , V_t , g_t , R_t oder die Gestalt der IV-Kurve. Zusätzlich waren alle durch Novobiocin hervorgerufenen Veränderungen vollständig durch Amilorid aufhebbar. Selbst bei Häuten, die eine deutliche sekundäre

g_t - oder R_t -Änderung zeigten, gingen alle elektrischen Parameter auf Werte zurück, die unter Amilorid allein (ohne Novobiocin) bestimmt wurden. Im Gegensatz dazu war der g_t -Zuwachs durch einfachen Auswasch des Antibiotikums oft nicht vollständig rückgängig zu machen (siehe Abb. 13).

Der Wirkungsmechanismus der "external agents" scheint in einer Aufhebung der Natrium-Selbsthemmung der apikalen Natriumkanäle zu bestehen. Kirschner (1955) vermutete, daß Atropin eine Art Autoinhibition des trans-epithelialen Natriumtransports vermindert, da er den stimulierenden Effekt der Substanz nur bei hohen Natriumkonzentrationen $(Na^+)_{\text{O}}$ beobachten konnte. Johnston und Hoshiko (1971) folgerten, im wesentlichen aufgrund desselben Befundes, daß Novobiocin die Selbsthemmung des Natriumtransports an der äußeren, den Transport begrenzenden, Barriere aufhebt. Diese Ansicht zweifelten später Cruz und Biber (1976) an, indem sie zeigten, daß in Anwesenheit von Novobiocin sowohl der apikale Natriumeinstrom (i_{12}) als auch der Kurzschlußstrom (I_{sc}) bei hohen Natriumkonzentrationen $(Na^+)_{\text{O}}$ noch Sättigungsverhalten zeigten. Dieser anscheinende Widerspruch beruht nicht auf Unterschieden der untersuchten Froschspezies, da beide Untersuchungen an Häuten von *Rana pipiens* durchgeführt wurden.

In der vorliegenden Arbeit konnten mehrere Hinweise für eine Verminderung der Natrium-Selbsthemmung gefunden werden. Durch Erniedrigung der Natriumkonzentration im Außenbad $(Na^+)_{\text{O}}$ wurden sowohl die absolute als auch die relative Stimulation des Kurzschlußstroms I_{sc} deutlich reduziert. Überdies bewirkt Novobiocin eine Erhöhung des K_{Na} -Wertes, was eine erniedrigte Affinität des Selbsthemmungsmechanismus anzeigt. Schließlich war das "recline"-Phänomen bei raschem Übergang von niedriger zu hoher

Natriumkonzentration deutlich abgeschwächt. Die stimulierende Wirkung von Novobiocin auf den I_{sc} war nach dem Badewechsel sofort sichtbar, was dahin interpretiert werden kann, daß der Mechanismus der Selbstinhibition blockiert werden kann, bevor er wirksam werden konnte. Andererseits ist aber die Selbsthemmung des Natriumtransportes nicht vollständig aufgehoben, da selbst in Anwesenheit von Novobiocin der I_{sc} keine lineare Funktion von $(Na^+)_{\text{O}}$ und das "recline"-Phänomen noch nachweisbar ist. Allerdings sollte, selbst wenn die Natrium-Selbsthemmung vollständig aufgehoben wäre, der Natriumtransport wegen des limitierenden Leistungsvermögens des aktiven Transportschritts noch ein Sättigungsverhalten zeigen.

Aus Abbildung 25 geht hervor, daß die Abhängigkeit des I_{sc} von der Natriumpermeabilität P_{Na} ein deutliches Sättigungsverhalten aufweist, das durch eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden kann. Dies bedeutet, daß durch die Gabe von Novobiocin kein grundsätzlich neuer Zusammenhang zwischen P_{Na} und I_{sc} geschaffen wird, sondern daß Novobiocin den "Arbeitsbereich" der Funktion zu höheren Permeabilitäten verschiebt. Ein weiteres Anzeichen für die Beibehaltung der Arbeitscharakteristik des Epithels unter Novobiocin läßt sich auch aus der Abhängigkeit des I_{sc} vom fraktionellen Widerstand $f(R_o)$ durch das Ineingreifen von Kontroll- und Novobiocindaten erkennen (Abb. 27). Ein hoher fraktioneller Widerstand und ein niedriger I_{sc} sind Kennzeichen einer ausgeprägten Selbsthemmung der Haut. Unter Kontrollbedingungen kann man davon ausgehen, daß die Häute im allgemeinen stark selbstgehemmt sind. Durch Novobiocin wird nun diese Selbsthemmung der Haut aufgehoben. Der verstärkte Natriumeinstrom führt dazu, daß die intrazelluläre Natriumkonzentration $(Na^+)_{\text{i}}$ im Transportkompartiment ansteigt, die Na^+-K^+ -Pumpe aktiviert wird und so der

Natriumtransport erhöht ist, was sich in der Zunahme des I_{sc} widerspiegelt. Aus der Abb. 27 scheint sich ähnlich wie in Abb. 26 auch ein Sättigungsverhalten des I_{sc} bei etwa $80 \mu A/cm^2$ anzudeuten.

Der zunehmende Natriumeinstrom ruft eine ausgeprägte Depolarisation des Membranpotentials U_o hervor, welche zusammen mit dem Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration (Rick et al., 1981) die treibende elektrochemische Kraft des Natriumeinstroms deutlich erniedrigt. Dieser Abfall des Potentials um mehr als 50 % des Kontrollwertes geht mit einer Abnahme des fraktionellen Widerstandes $f(R_o)$ einher (Abb. 28). Für eine unveränderte intrazelluläre Natriumkonzentration (10 mmol) würde U_o in Abhängigkeit vom fraktionellen Widerstand alle Werte zwischen $E_K = -90$ mV, bei $f(R_o) = 1.0$ und $E_{Na} = 60$ mV, bei $f(R_o) = 0$, durchlaufen. Im Fall $f(R_o) = 1.0$ würde also alleine die Innenmembran das Potential bestimmen, da $R_i \ll R_o$ gelten würde. Umgekehrt würde für $f(R_o) \rightarrow 0$ die Außenmembran immer mehr zum dominierenden Faktor. Der in Abb. 28 dargestellte tatsächliche Zusammenhang zwischen U_o und $f(R_o)$ weicht insbesondere für niedrige $f(R_o)$ -Werte von der erwarteten Beziehung ab. Die zu hohen Werte für U_o lassen sich wahrscheinlich auf eine Zunahme der zellulären Natriumkonzentration und damit auf eine Abnahme von E_{Na} zurückführen.

Die mögliche Verminderung der Selbstinhibition erklärt, warum die relative Stimulation des I_{sc} bei niedrigen Ausgangswerten am größten ist (Abb. 11). Es ist möglich, daß die I_{sc} -Variation in den Kontrollwerten zumindest teilweise eine Schwankung im Ausmaß der Natrium-Selbsthemmung wiedergibt. Diese Annahme erklärt aber nicht, weshalb die absolute Stimulation allem Anschein nach über den gesamten I_{sc} -Bereich konstant ist. Auf der

anderen Seite scheint zumindest bei *Rana esculenta* die lineare Regression nicht das beste mathematische Modell zu sein, um die Abhängigkeit des durch Novobiocin stimulierten I_{sc} vom Kontroll- I_{sc} zu beschreiben, da sich bei einem Kontroll- I_{sc} zwischen 15 und 30 $\mu A/cm^2$ ein Maximum der absoluten I_{sc} -Steigerung erkennen läßt.

Li und Lindemann (1983a) diskutierten ein 3-Zustands-Modell für den apikalen Natriumkanal, um die stimulierenden Wirkungen des Amiloridanalogs BIG (Benzimidazolyl guanidine) und des SH-Reagens PCMPs (Para-chloro-Mercuriphenyl sulfat) zu erklären. Der Kanal kann sich in einem offenen, einem geschlossenen, durch Amilorid blockierten, und in einem geschlossenen Natrium blockierten Zustand befinden. BIG und PCMPs lassen die Anzahl der offenen, leitenden Kanäle durch Änderung der Ratenkonstanten für die $(Na^+)_o$ -Blockade zunehmen. Das Modell sagt ein Anwachsen in der anscheinend makroskopischen Affinität für Amilorid voraus. Tatsächlich reduzieren BIG und PCMPs den K_a -Wert bei Untersuchungen der Haut von *Rana ridibunda* von 2.45 auf 0.74 μM bzw. von 2.59 auf 0.59 μM . In der vorliegenden Untersuchung bewirkt Novobiocin eine ähnliche K_a -Änderung von 1.72 auf 0.42 μM . Fuchs et al. (1977) nahmen an, daß die Natrium-Selbstinhibition das Resultat einer Bindung von Natrium an einen externen modifizierenden Bindungsort sei. In einer späteren Veröffentlichung bauten Li und Lindemann (1983b) dieses Modell aus, indem sie postulierten, daß möglicherweise alle Amilorid ähnlichen Moleküle mit der Natrium-Selbsthemmung an einem "Vor-Block"-Bindungsort konkurrieren können.

In Anbetracht dessen, daß Novobiocin bei physiologischem pH negativ geladen ist - die molekulare Struktur zeigt Abbildung 31 - erscheint es eher

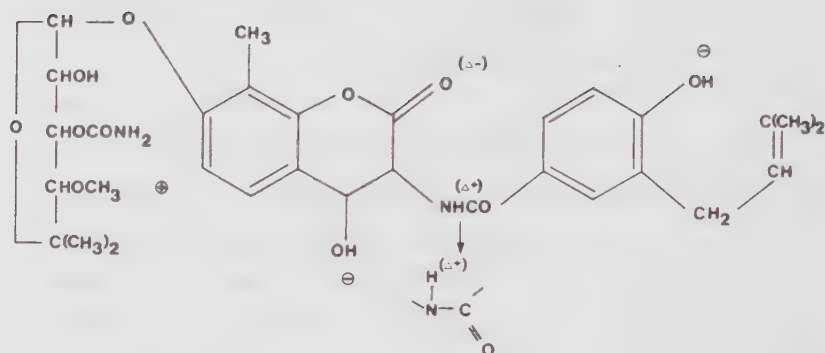


Abb. 31: Molekulare Strukturformel von Novobiocin. Nach Goodman & Gillman, 1965 und Nagel, persönliche Mitteilung.

unwahrscheinlich, daß das Molekül an Stellen binden könnte, die für Kationen wie Natrium und Amiloridanalogue zugänglich sind. Andererseits besitzt das Molekül eine Aminogruppe, welche positiv geladen sein wird. Die Wirkung von Novobiocin zeigte eine ausgeprägte pH_0 -Abhängigkeit. Dies läßt vermuten, daß die undissoziierte Novobiocinsäure weniger effektiv ist, oder daß ein möglicher Bindungsort eine titrierbare Gruppe enthält. Das Fehlen eines Effekts von Novobiocin bei niedrigem pH_0 kann nicht auf einen weniger wirkungsvollen Selbsthemmechanismus zurückgeführt werden, da bei Häuten von *Rana esculenta* das Sättigungsphänomen noch bei $pH = 5.5$ zu zeigen war (Rick, persönliche Mitteilung).

Da von Lanthan und einigen organischen Verbindungen bekannt ist, daß sie mit Kalzium Ca^{2+} der Membran interagieren, nahmen de Sousa und Grosso (1973) und Grosso und de Sousa (1978) an, daß ein Ca^{2+} -Bindungsort der gemeinsame Rezeptorort für "external agents" sein könnte. Ein hemmender Effekt von extrazellulärem Ca^{2+} wurde für *Rana pipiens* nachgewiesen (Herrera & Curran, 1963; Curran et al., 1963). Weiterhin spielt wahrscheinlich intrazelluläres Ca^{2+} als Vermittler einer "feedback"-Hemmung durch intrazelluläres Natrium eine Rolle (Grinstein & Elij, 1978; Taylor & Windhager, 1979; Chase & Al-Awqati, 1981). Die Ansicht, daß Ca^{2+} am natriferischen Verhalten für "external agents" beteiligt sein könnte, kann in der vorliegenden Untersuchung etwas bekräftigt werden. Diltiazem, ein Ca^{2+} -Antagonist, ruft ähnliche Wirkungen wie Novobiocin hervor. Im Gegensatz zu Novobiocin war aber die I_{sc} -Stimulation nicht dauerhaft. Zudem war die Reaktion auf Diltiazem bei wiederholter Gabe sehr stark vermindert. Für einen teilweise gemeinsamen Wirkungsmechanismus spricht, daß die Wirkung von Novobiocin nach vorhergehender Diltiazem-Gabe vermindert war. Eine direkte Kompetition zwischen Novobiocin und Diltiazem konnte nicht gezeigt werden, da bei 1 mM Konzentrationen die Substanzen einen unlöslichen Niederschlag bildeten.

In dieser Arbeit wurde die treibende Kraft des transepithelialen Natriumtransports E_{Na} mit zwei unterschiedlichen Verfahren bestimmt. Von Yonath und Civan wurde für ein vereinfachtes Äquivalent-Strom-Modell des transepithelialen Natriumtransports gezeigt, daß I_{sc} linear mit g_t variieren sollte, vorausgesetzt, daß die Summe der elektromotorischen Kräfte der einzelnen Transportschritte, ($E_{\text{Na}} = E_o + E_i$) konstant bleibt (Yonath & Civan, 1971). In diesem Fall kann E_{Na} aus der inversen Steigung der Beziehung g_t

gegen I_{sc} erhalten werden. Tatsächlich konnte in der Mehrheit aller Fälle in der initialen Phase der Novobiocinwirkung eine lineare Beziehung zwischen g_t und I_{sc} beobachtet werden. Als Mittelwert für E_{Na} wurde 139 mV bestimmt, signifikant kleiner als der Wert 161 mV, der mit den mittleren Na^+ - und K^+ -Konzentrationen für *Rana esculenta*, erhalten durch die Elektronenstrahlmikroanalyse (Rick et al., 1984), errechnet werden kann. Die Voraussetzungen, die in diese Berechnung eingehen, sind, daß die intrazellulären Aktivitätskoeffizienten für Na^+ und K^+ identisch sind und daß E_o und E_i mit den elektrochemischen Gleichgewichtspotentialen von Na^+ bzw. K^+ übereinstimmen. Zieht man zusätzlich in Betracht, daß die Na^+ -Konzentration in der äußersten Zellschicht leicht höher ist als im Durchschnitt des Epithels, reduziert sich der berechnete E_{Na} -Wert auf 157 mV.

Die zweite Methode benutzt den Schnittpunkt der Novobiocin und Amilorid IV-Kurven, um E_{Na} zu bestimmen. Bei diesem Potential ist der Strom im transzellulären Weg etwa Null, und deshalb sollten sich die Potentiale über die äußere und innere Membran E_o bzw. E_i annähern. Der Wert 141 mV für E_{Na} , der auf diese Weise erhalten wird, ist niedriger als die Abschätzung durch die Elektronenstrahlmikroanalyse für Kontrollhäute. Dieser Wert ist aber nahezu identisch mit der Abschätzung, wenn man die Elementdaten von Novobiocin stimulierten Häuten zugrunde legt, die parallel zu der vorliegenden Untersuchung mit der Elektronenstrahlmikroanalyse gewonnen wurden (= 140 mV, Rick et al., persönliche Mitteilung). Eine Abnahme von E_{Na} durch Novobiocin kann wegen des Anwachsens in der intrazellulären Na^+ -Konzentration und des Absinkens der K^+ -Konzentration (Rick et al., 1981b) erwartet werden. Ein Anzeichen für ein Novobiocin induziertes Absinken von E_{Na} wurde auch in dieser Arbeit erhalten, da die Kontroll-

IV-Kurven im allgemeinen einen höheren Schnittpunkt mit der Amiloridkurve zeigten (siehe Abb. 20).

Eine nahezu lineare Beziehung wurde auch zwischen den Gleichgewichtswerten von g_{tc} und I_{sc} (siehe Abb. 19) beobachtet. Die Daten für Kontroll- und Novobiocin stimulierte Häute streuen um dieselbe Gerade. Dies deutet an, daß Novobiocin lediglich den Bereich dieser Relation zu höheren Werten ausdehnt. Der E_{Na} -Wert berechnet aus der inversen Steigung der Geraden ist nur 117 mV. Ähnlich niedrige Werte werden von den Steigungen der Verbindungsgeraden der korrespondierenden Datenpunkte erhalten (129 mV), oder von mittleren I_{sc} und g_t Änderungen aus Tabelle 3 (= 114 mV). Derartig niedrige Werte müssen erwartet werden, wenn der Zuwachs im I_{sc} parallel mit dem Anwachsen der intrazellulären Na^+ -Konzentration verläuft. In dem Ausmaß, in dem während der ersten Phase der Novobiocinwirkung die intrazelluläre Na^+ -Konzentration schon steigt, wird der Yonath und Civan Graph fälschlich zu niedrige Werte für E_{Na} angeben.

Der Graph g_{tc} gegen I_{sc} schneidet die g_{tc} -Achse in einem Punkt größer als Null. Ähnlich zu den Yonath und Civan Graphen waren die Werte der Achsenabschnitte mit der g_{tc} -Achse immer größer als die g_{sh} -Werte, bestimmt durch Zugabe von Amilorid. Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß Amilorid die "shunt"-Leitfähigkeit des freitransportierenden Epithels leicht unterbestimmt. Eine mögliche Erklärung könnte ein hemmender Effekt von Amilorid auf die "shunt"-Leitfähigkeit sein, wie er für Triaminopyridin an der Gallenblase gezeigt wurde (Moreno, 1982). Der "shunt"-Widerstand könnte aber auch aufgrund eines Kollabierens der Interzellularspalten anwachsen. Geht man von der Größe der Spalten, wie sie in

schockgefrorenen, gefriergetrockneten Schnitten zu sehen ist, aus (siehe z.B. Rick et al., 1978) beträgt der Widerstand der Intrazellulärspalten in Kontroll epithelien etwa $4 \Omega \text{ cm}^2$, oder liegt unter Berücksichtigung einiger Inhomogenitäten vielleicht zwischen 10 und $15 \Omega \text{ cm}^2$. In Amilorid behandelten Häuten ist die Weite der Spalten zwischen den Zellen etwa um einen Faktor 3 bis 4 reduziert (Rick, nicht publiziert). Dies führt zu einer Zunahme des berechneten Teilwiderstandes der interzellulären Spalten auf etwa $50 \Omega \text{ cm}^2$. Der Wert ist noch etwa um einen Faktor 10 zu klein, um die beobachteten Unterschiede zwischen g_{sh} ($3.99 \text{ k } \Omega \cdot \text{cm}^2$) und mittlerem g_{tc} -Achsenabschnitt ($3.43 \text{ k } \Omega \cdot \text{cm}^2$) zu erklären. Der durch Novobiocin ausgelöste sekundäre Leitfähigkeitsanstieg g_{t} basiert zumindest teilweise auf einer Zunahme der transepithelialen Cl^- -Leitfähigkeit. Dafür spricht, daß er niemals in Cl^- -freiem Medium auftrat. Wenn Cl^-_0 plötzlich auf Null reduziert wurde, kam es zu einem unmittelbaren Anstieg im I_{sc} und Abfall in g_{t} (Abb. 21); beide Effekte sind durch eine Chloridleitfähigkeit erklärbar. Die erhöhte Cl^- -Leitfähigkeit wird allem Anschein nach während der Cl^- -freien Inkubation abgeschaltet, was durch ein paralleles Absinken der I_{sc} - und g_{t} -Komponenten deutlich wird. Diese Rückbildung wird noch nach dem Zurückgehen auf Cl^- -haltige Lösung fortgesetzt. Der sekundäre g_{t} -Anstieg ist zudem Amilorid empfindlich. Er wurde niemals in Anwesenheit von Amilorid beobachtet und konnte immer durch die Zugabe von Amilorid rückgängig gemacht werden. Diese Daten legen eine zelluläre Regulation des "tight junction"-Widerstandes möglicherweise durch Änderungen der intrazellulären Natriumkonzentration der Zellen des Stratum granulosum nahe.

In einigen Häuten von *Rana esculenta* wurde eine Ba^{2+} -sensitive K^+ -Permeabilität beobachtet. Die Tatsache, daß die K^+ -Leitfähigkeit auch in einer

Haut, die nicht zuvor mit Novobiocin behandelt war, gefunden wurde, schließt die Möglichkeit aus, daß die K^+ -Permeabilität lediglich durch Novobiocin induziert wird. Eine Ba^{2+} -sensitive apikale K^+ -Leitfähigkeit wurde unter bestimmten Bedingungen bei *Rana temporaria* (Nagel & Hirschmann, 1980; Zeiske & Van Driessche, 1979) gezeigt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Novobiocin auf den transepithelialen Natriumtransport der Haut der Froschspezies *Rana esculenta* und *Rana temporaria* beschrieben. Dabei wurden neben der Aufzeichnung transepithelialer elektrischer Parameter, wie Kurzschlußstrom und transmembranale Leitfähigkeit, intrazelluläre Potentialmessungen mit Mikroelektroden durchgeführt. Zusätzlich wurden intrazelluläre Elementkonzentrationen, speziell die von Natrium, durch die Elektronenstrahlmikroanalyse erhalten.

Das Antibiotikum Novobiocin gehört zu einer Gruppe von Substanzen, den sogenannten "external agents", die den aktiven Natriumtransport der Froshaut und anderer Epithelien stimulieren. Bei Zugabe von Novobiocin zum Außenbad war neben einer starken Zunahme der transepithelialen Potentialdifferenz und des Kurzschlußstroms eine deutliche Depolarisation des intrazellulären Potentials, begleitet von einem signifikanten Abfall des fraktionellen Widerstandes, zu beobachten. Zusätzlich zu einer unterschiedlichen Empfindlichkeit der zwei Froschspezies - *Rana esculenta* zeigte eine merklich stärkere Natriumtransportsteigerung als *Rana temporaria* - konnte eine jahreszeitliche Schwankung in der Wirkung festgestellt werden. So zeigten die Frösche im Sommer nur eine relativ geringe Transporterhöhung.

Die Versuchsergebnisse zeigen eine direkte Interaktion von Novobiocin mit der apikalen Membran der Epithelzellen. Novobiocin wirkte nur von der apikalen Seite stimulierend auf den Natriumeinstrom. Alle Wirkungen der Substanz, die Steigerung des Kurzschlußstroms, des transepithelialen Poten-

tials und der Leitfähigkeit über die Membran, die Depolarisation des Zellpotentials und die Erniedrigung des fraktionellen Widerstands, der das Verhältnis des Außenmembranwiderstands zum Gesamtwiderstand angibt, waren vollständig durch Amilorid hemmbar. Umgekehrt war Novobiocin völlig wirkungslos, wenn Amilorid schon im apikalen Bad vorhanden war. Dies deutet darauf hin, daß Novobiocin nur auf Amilorid-empfindliche Natriumkanäle, die in der apikalen Membran angenommen werden, direkt wirkt.

Der Wirkungsmechanismus von Novobiocin, wie auch anderer "external agents", scheint in einer teilweisen Befreiung der apikalen Natriumkanäle von der Natriumselbsthemmung zu liegen. Diese Selbsthemmung könnte auf der Bindung von Natrium an eine äußere modifizierbare Bindungsstelle "Vor-Block" beruhen. Möglicherweise reagiert Novobiocin kompetitiv mit der Natriumselbsthemmung an diesem Bindungsort.

Für eine Aufhebung der Natriumselbsthemmung durch Novobiocin sprechen folgende Beobachtungen: die Zunahme der apikalen Natriumpermeabilität (P_{Na}), die Verschiebung der scheinbaren Dissoziationskonstanten der Konzentrationsabhängigkeit des Transports (K_{Na}) zu höheren Werten und die Hemmung des "recline"-Phänomens, d.h. ein deutlich geringerer sekundärer Abfall des Kurzschlußstroms nach plötzlichem Wechsel von niedriger auf hohe Natriumkonzentration im Außenbad.

Die treibende Kraft des transepithelialen Natriumtransports E_{Na} wurde sowohl anhand eines vereinfachten Äquivalent-Strom-Modells (Yonath und Civan Graph) als auch aus dem Schnittpunkt der Novobiocin und Amilorid IV-Kurven bestimmt. Mit beiden Methoden läßt sich unter Novobiocin ein

signifikantes Absinken von E_{Na} im Vergleich zu Kontrollbedingungen feststellen. Diese Abnahme von E_{Na} unter Novobiocin kann durch das Anwachsen der intrazellulären Natriumkonzentration und das Absinken der zellulären Kaliumkonzentration erklärt werden.

Alle Ergebnisse der Arbeit unterstützen die Ansicht, daß Novobiocin primär den apikalen Natriumeinstrom, möglicherweise durch Blockierung des Natriumselbsthemmungsmechanismus, stimuliert.

LITERATURVERZEICHNIS

Aceves, J.:

Pumped movements of sodium and potassium ions in the isolated epithelium of the frog skin.

Pflügers Arch. 371:201, 1977

Aceves, J. und Erlj, D.:

Sodium transport across the isolated epithelium of the frog skin.

J. Physiol. 212:195, 1971

Adrian, R.H.:

The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle.

J. Physiol. 133:631, 1956

Adrian, R.H. und Slayman, C.L.:

Membrane potential and conductance during transport of sodium, potassium, and rubidium in frog muscle.

J. Physiol. 184:970, 1966

Archibald, A.R., Armstrong, J.J., Baddiley, J. und Hay, J.B.:

Teichoic acids and the structure of bacterial walls.

Nature 191:570, 1961

Asano, Y., Tashima, Y., Matsui, H., Nagano, K. und Nakao, M.:

(Na⁺-K⁺)-ATPase from the frog bladder and its relationship to sodium transport.

Biochim. Biophys. Acta 219:169, 1970

Baker, P.F., Hodgkin, A.L. und Shaw, T.J.:

The effects of changes in internal ionic concentrations on the electrical properties of perfused giant axons.

J. Physiol. 164:355, 1962

Bauer, R. und Rick, R.:

Computer analysis of X-ray spectra (EDS) from thin biological specimens.
X-ray Spectrom. 7:63, 1978

Biber, T.U.L.:

Effect of changes in transepithelial transport on the uptake of sodium
across the outer surface of the frog skin.

J. Gen. Physiol. 58:131, 1971

Biber, T.U.L., Aceves, J. und Mandel, L.:

Potassium uptake across serosal surface of isolated frog skin epithelium.

Am. J. Physiol. 222:1366, 1972a

Biber, T.U.L., Cruz, J. und Curran, P.F.:

Sodium influx at the outer surface of frog skin. Evaluation of different
extracellular markers.

J. Membrane Biol. 7:365, 1972b

Biber, T.U.L., Chez, R.A. und Curran, P.F.:

Na-transport across frog skin at low external Na concentrations.

J. Gen. Physiol. 49:1161, 1966

Biber, T.U.L. und Cruz, L.J.:

Effect of antidiuretic hormone on sodium uptake across the outer surface
of frog skin.

Am. J. Physiol. 225:912, 1973

Biber, T.U.L. und Curran, P.F.:

Direct measurement of uptake of sodium at the outer surface of the frog
skin.

J. Gen. Physiol. 56:83, 1970

Biber, T.U.L. und Sanders, M.L.:

Influence of transepithelial potential difference on the sodium uptake at
the outer surface of the isolated frog skin.

J. Gen. Physiol. 61:529, 1973

Bonting, S.L. und Caravaggio, L.:

Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. V. Correlation of enzyme activity with cation flux in six tissues.

Arch. Biochem. Biophys. 101:37, 1963

Bonting, S.L. und Canady, M.R.:

Na-K-activated adenosine triphosphatase and sodium transport in toad bladder.

Am. J. Physiol. 207:1005, 1964

Boulpaep, E.L.:

Electrical phenomena in the nephron.

Kidney Int. 9:88, 1976

Boulpaep, E.L.:

Electrical properties of individual membranes of proximal renal tubule cells.

In: Renal Function, edited by G.H. Giebisch and E.F. Purcell. New York, Josiah Macy Jr. Found., 149, 1977

Brock, T.D.:

Magnesium binding as an explanation of the mode of action of novobiocin.

Science 136:316, 1962

Brown, A.C. und Kastella, K.G.:

The ac impedance of frog skin and its relation to active transport.

Biophys. J. 5:591, 1965

Candia, O.A. und Zadunaisky, J.A.:

Potassium flux and sodium transport in the isolated frog skin.

Biochim. Biophys. Acta 468:341, 1977

Carasso, N., Favard, P., Jard, S. und Rajerison, R.M.:

The isolated frog skin epithelium. I. Preparation and general structure in different physiological states.

J. Microscopie 10:315, 1971

Cereijido, M., Herrera, F., Flanigan, W.J. und Curran, P.F.:

The influence of Na concentration on Na-transport across frog skin.

J. Gen. Physiol. 47:879, 1964

Cereijido, M. und Curran, P.F.:

Intracellular electric potentials in frog skin.

J. Gen. Physiol. 48:543, 1965

Cereijido, M. und Rotunno, C.A.:

Transport and distribution of sodium across the frog skin.

J. Physiol. 190:481, 1967

Cereijido, M. und Rotunno, C.A.:

The effect of antidiuretic hormone on Na movement across frog skin.

J. Physiol. 213:119, 1971

Chase, H.S. und Al-Awqati, Q.:

Regulation of the sodium permeability of the luminal border of toad bladder by intracellular sodium and calcium.

J. Gen. Physiol. 77:693, 1981

Civan, M.M.:

Effect of active sodium transport on current-voltage relationship of toad bladder.

Am. J. Physiol. 219:234, 1970

Civan, M.M., Kedem, O. und Leaf, A.:

Effect of vasopressin on toad bladder under conditions of zero net sodium transport.

Am. J. Physiol. 211:569, 1966

Claude, P. und Goodenough, D.A.:

Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia.

J. Cell Biol. 58:390, 1973

Conway, E.J.:

Nature and significance of concentration relations of potassium and sodium ions in skeletal muscle.

Physiol. Rev. 37:84, 1957

Cortas, N. und Walser, M.:

(Na⁺-K⁺)-activated ATPase in isolated mucosal cells of toad bladder.

Biochim. Biophys. Acta 249:181, 1971

Cox, C. und Helman, S.J.:

Effects of ouabain and furosemide on basolateral membrane Na efflux of frog skin.

Am. J. Physiol. 245:6, 1983

Cruz, L.J. und Biber, T.U.L.:

Transepithelial transport kinetics and Na entry in frog skin: effects of nobobiocin.

Am. J. Physiol. 231:1866, 1976

Curran, P.F., Herrera, F.C. und Flanigan, W.J.:

The effect of Ca and antidiuretic hormone on Na transport across frog skin: sites and mechanisms of action.

J. Gen. Physiol. 46:1011, 1963

Curran, P.F. und Cereijido, M.:

K⁺-fluxes in frog skin.

J. Gen. Physiol. 48:1011, 1965

Curtiz, H.J. und Cole, K.S.:

Membrane resting and action potentials from the squid giant axon.

J. Cell. Comp. Physiol. 19:135, 1942

De Sousa, R.C.:

On membrane transport and amphibian epithelia: some recent acquisitions.

Inserm. 85:337, 1979

De Sousa, R.C. und Grosso, A.:

Effect of diphenylhydantoin on transport processes in frog skin (*Rana ridibunda*).

Experientia 29:1097, 1973

De Sousa, R.C., Marguerat, J. und Grosso, A.:

Effects of lanthanides on transport processes of amphibian epithelia.
Experientia 29:748, 1973

DeVoe, R. und Maloney, P.C.:

Principles of cell homeostasis.

In: Medical Physiology, edited by Mountcastle, B., 14. Edition, Vol. I, 1980

Diamond, J.M.:

Transport of salt and water in rabbit and guinea pig gall bladder.

J. Gen. Physiol. 48:1, 1964

Dobson, J.G. Jr. und Kidder, G.W.:

Edge damage effect in vitro frog skin preparations.

Am. J. Physiol. 214:719, 1968

Dörge, A. und Nagel, W.:

Effect of amiloride on Sodium transport in the frog skin: II. sodium transport pool and unidirectional fluxes.

Pflügers Arch. 321:91, 1970

Dörge, A., Gehring, K., Nagel, W. und Thurau, K.:

Localization of sodium in frog skin by electron microprobe analysis.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 281:271, 1974

Dörge, A., Rick, R. und v. Arnim, E.:

Action of Bay g 2821 on transepithelial sodium transport of frog skin.

Pharmatherapeutica 1/6:341, 1977

Dörge, A., Rick, R., Gehring, K. und Thurau, K.:

Preparation of freeze-dried cryosections for quantitative X-ray microanalysis of electrolytes in biological soft tissues.

Pflügers Arch. 373:85, 1978

Dörge, A., Rick, R., v. Arnim, E. und Thurau, K.:

Effect of muzolimine on transepithelial sodium transport of frog skin epithelium.

Clin. Nephrol. 19, Suppl. 1:11, 1983

Donnan, F.G.:

The theory of membrane equilibria.

Chem. Rev. 1:73, 1924

Eigler, J., Kelter, J. und Renner, E.:

Wirkungscharakteristika eines neuen Acylguanidins-Amilorid-HCl (MK 870) an der isolierten Haut von Amphibien.

Klin. Wschr. 14:737, 1967

Els, W.J. und Helman, S.I.:

Vasopressin, theophylline, PGE₂ and indomethacin on active Na transport in frog skin: studies with microelectrodes.

Am. J. Physiol. 241:10, 1981

Engbaek, L. und Hoshiko, T.:

Electrical potential gradients through the frog skin.

Acta Physiol. Scand. 39:384, 1957

Erlj, D.:

Salt transport across isolated frog skin.

Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 262:69, 1971

Erlj, D.:

Solute transport across isolated epithelial.

Kidney Int. 9:76, 1976

Erlj, D. und Martinez-Palomo, A.:

Opening of tight junctions in frog skin by hypertonic urea solution.

J. Membrane Biol. 9:220, 1972

Erlj, D. und Martinez-Palomo, A.:

Opening of tight junctions in toad urinary bladders by hypertonic solutions.

Fed. Proc. 32:218, 1973

Erlj, D. und Smith, M.W.:

Sodium uptake by the outside surface of frog skin.

J. Physiol. 218:33P, 1971

Erlj, D. und Smith, M.W.:

Sodium uptake by frog skin and its modification by inhibitors of transepithelial sodium transport.

J. Physiol. 228:221, 1973

Ernst, S.A. und Mills, J.W.:

Basolateral plasma membrane localization of ouabain-sensitive sodium transport sites in the secretory epithelium of the civian salt glands.

J. Cell. Biol. 75:74, 1977

Essig, A. und Leaf, A.:

The role of potassium in active transport of sodium by the toad bladder.

J. Gen. Physiol. 46:505, 1963

Farquhar, M. und Palade, G.E.:

Junctional complexes in various epithelia.

J. Cell. Biol. 17:374, 1963

Farquhar, M.G. und Palade, G.E.:

Cell junctions in amphibian skin.

J. Cell. Biol. 26:263, 1965

Finklestein, A.:

Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes.

J. Gen. Physiol. 68:127, 1976

Finklestein, A. und Cass, A.:

Permeability and electrical properties of thin lipid membranes.

J. Gen. Physiol. 52:1455, 1968

Fischer, R., Erlj, D. und Helman, S.I.:

Intracellular voltage of isolated epithelia of frog skin - apical and basolateral cell punctures.

J. Gen. Physiol. 76:447, 1980

Freeman, A.R.:

Electrophysiological activity of tetrodotoxin on the resting membrane of the squid axon.

Comp. Biochem. Physiol. 40A:71, 1971

Frizzell, R.A. und Schultz, S.G.:

Ionic conductances of extracellular shunt pathway in rabbit ileum. Influences of shunt on transmural sodium transport and electrical potential differences. J. Gen. Physiol. 59:318, 1972

Frömter, E.:

The route of passive ion movement through the epithelium of Necturus gallbladder.

J. Membrane Biol. 8:259, 1972

Frömter, E. und Diamond, J.H.:

Route of passive ion permeation in epithelia.

Nature London New Biol. 235:9, 1972

Frömter, E. und Gebler, B.:

Electrical properties of amphibian urinary bladder epithelia. III. The cell membrane resistance on the effect of amiloride.

Pflügers Arch. 371:99, 1977

Fuchs, W., Gebhardt, U. und Lindemann, B.:

Delayed voltage responses to fast changes of $(Na)_o$ at the outer surface of frog skin epithelium.

In: Passive permeability of cell membranes, Series Biomembranes, Vol. 3, 483, (Hrsg. F. Dreuzer und J.F.G. Slegers) Plenum, New York, London, 1972

Fuchs, W., Hviid Larsen, E. und Lindemann, B.:

Estimation of intracellular Na-activity and of Na-permeability from current-voltage curves of Na-channels in frog skin.

Pflügers Arch. Ges. Physiol. 355:R71, 1975

Fuchs, E., Hviid Larsen, E. und Lindemann, B.:

Current-voltage curve of sodium channels and concentration dependence of sodium permeability in frog skin.

J. Physiol. 267:137, 1977

Fujimoto, J.M. Lech, J.J. und Zarnatowski, R.:

A site of action of novobiocin in inhibiting renal tubular transport of drugs in the chicken.

Biochem. Pharmacol. 22:971, 1973

Fülgraff, G., Gulden, W.D. und Rudroff, W.D.:

Effect of furosemide on sodium transport in frog skin.

Arch. Pharmacol. 280:23, 1973

Garay, R.P. und Garrahan, P.J.:

The interaction of sodium and potassium with the sodium pump in red cells.

J. Physiol. 231:297, 1973

Garcia-Romeu, F.:

Stimulation of sodium transport in frog skin by 2-imidazolines (guanidine-benzimidazole and phentolamine).

Life Sci. 15:539, 1974

Garcia-Romeu, F., Salibian, A. und Pezzani-Hernández, S.:

The nature of the in vivo sodium and chloride uptake mechanisms through the epithelium of the chilean frog calyptocephalla gayi.

J. Gen. Physiol. 53:816, 1969

Garrahan, P.J. und Glynn, I.M.:

Stoichiometry of the sodium pump.

J. Physiol. 192:217, 1967

Gelarden, R.T. und Rose, R.C.:

Electrical properties and diffusion potentials in the gallbladder of man, monkey, dog, goose and rabbit.

J. Membr. Biol. 19:37, 1974

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H. und Nash, H.A.:

DNA gyrase: An enzyme that introduces superhelical turns into DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3872, 1976

Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M.H., Itoh, T. und Tomizawa, J.:
Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA
gyrase activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:4772, 1977

Giebisch, G., Sullivan, L.P. und Whittetbury, G.:
Relationship between tubular net sodium reabsorption and peritubular
potassium uptake in the perfused Necturus kidney.

J. Physiol. 230:51, 1973

Glynn, I.M. und Karlish, S.J.D.:

The sodium pump.

Am. Rev. Physiol. 37:13, 1975

Goldman, D.E.:

Potential, impedance and rectification in membranes.

J. Gen. Physiol. 27:37, 1943

Goodman, L. und Gilman, A.:

The Pharmacological Basis of Therapeutics.

Macmillan, New York, Toronto, London, 3rd edition, 1282, 1965

Graf, J. und Giebisch, G.:

Intracellular sodium activity and sodium transport in Necturus gallbladder
epithelium.

J. Membrane Biol. 47:327, 1979

Grinstein, S., Candia, O. und Elij, D.:

Nonhormonal mechanisms for the regulation of transepithelial sodium
transport: The role of surface potential and cell calcium.

J. Membrane Biol. Special Issue:261, 1978

Grinstein, S. und Elij, D.:

Intracellular calcium and the regulation of sodium transport in the frog
skin.

Proc. R. Soc. Lond. B. 202:353, 1978

Grosso, A. und De Sousa, R.C.:

Vasopressin-like effects of psychotropic drugs in amphibian epithelia.

J. Membrane Biol. Special Issue: 305, 1978

Handler, J.S., Preston, A.S. und Orloff, J.:

Effect of ADH, aldosterone, ouabain and amiloride on toad bladder epithelial cells.

Am. J. Physiol. 222:1071, 1972

Helman, S.I. und Fisher, S.:

Stratum corneum of frog skin: Inferences for studies of Na entry and transport pool.

Am. J. Physiol. 232:C37, 1972a

Helman, S.I. und Fisher, R.S.:

Microelectrode studies of the active Na transport pathway of frog skin.

J. Gen. Physiol. 69:571, 1977b

Helman, S.I. und Miller, D.A.:

Edge damage effect on measurements of urea and sodium flux in frog skin.

Am. J. Physiol. 226:1198, 1974

Heptinstall, S., Archibald, A.R. und Baddiley, J.:

Teichoic acids and membrane function in bacteria.

Nature 225:519, 1970

Herrera, F.C. und Curran, P.F.:

The effect of Ca and antidiuretic hormone on Na transport across frog skin. I. Examination of interrelationships between Ca and hormone.

J. Gen. Physiol. 46:999, 1963

Higgins, J.T.Jr., Gebler, B. und Frömter, E.:

Electrical properties of amphibian urinary bladder. II. The cell potential profile in *Necturus maculosus*.

Pflügers Arch. 371:87, 1977

Hodgkin, A.L. und Horowicz, P.:

The effect of sudden changes in ionic concentrations on the membrane potential of single muscle fibers.

J. Physiol. 148:127, 1959

Hodgkin, A.L. und Katz, B.:

The effect of sodium ions on the electrical activities of the giant axon of the squid.

J. Physiol. 104:176, 1945

Hong, C.D. und Essig, A.:

Effects of 2-deoxy-D-glucose, amiloride, vasopressin, and ouabain on active conductance and E_{Na} in the toad bladder.

J. Membr. Biol. 28:121, 1976

Hoshi, T. und Sakai, F.:

A comparison of the electrical resistance of the surface cell membrane and cellular wall in the proximal tubule of the newt kidney.

Jap. J. Physiol. 17:627, 1967

Hoshiko, T. und Engbaek, L.:

Microelectrode study of the frog skin potential.

Proc. 20th Int. Physiol. Congress Brüssel, 443, 1956

Hughes, A.H., Stow, M., Hancock, I.C. und Baddiley, J.:

Function of teichoic acids and effect of novobiocin on control of Mg^{2+} at the bacterial membrane.

Nature (New Biol.) 229 (2):53, 1971

Hviid Larsen, E.:

Effect of amiloride, cyanide and ouabain on the active transport pathway in toad skin.

Alfred Benzon Symposium V: Transport mechanisms in epithelia, (Hrsg. H.H. Ussing und N.A. Thorn), Munksgaard, Copenhagen, Denmark, 131, 1973

Janacek, K.:

The effect of low concentrations of thiolgroup blocking agents on the outer membrane of frog skin.

Biochim. Biophys. Acta 56:42, 1962

Johnston, K.M. und Hoshiko, T.:

Novobiocin stimulation of frog skin current and some metabolic consequences.

Am. J. Physiol. 220:792, 1971

Katzin, L.I.:

The ionic permeability of frog skin as determined with the acid of radioactive indicators.

Biol. Bull. 77:402, 1939

Katzin, L.I.:

The use of radioactive tracers in the determination as irreciprocal permeability of biological membranes.

Biol. Bull. 79:342, 1940

Kidder, G.W., Cereijido, M. und Curran, P.F.:

Transient changes in electrical potential differences across frog skin.

Am. J. Physiol. 207:935, 1964

Kirschner, L.B.:

On the mechanism of active sodium transport across the frog skin.

J. Cell. Comp. Physiol. 45:61, 1955

Koefoed-Johnsen, V.:

The effect of g-strophantin (oubain) on the active transport of sodium through the isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. 42(145):87, 1957

Koefoed-Johnsen, V., Levi, H. und Ussing, H.H.:

The mode of passage of chloride ions through the isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. 25:150, 1952

Koefoed-Johnsen, V. und Ussing, H.H.:

The nature of the frog skin potential.

Acta Physiol. Scand. 42:298, 1958

Kramer, H.J.:

Effects of bumetanide on sodium transport of the isolated frog skin and on renal Na-K-ATPase.

Pharmacology 14:481, 1976

Kristensen, P.:

Chloride transport across isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. 84:338, 1972

Kuffler, S.W., Nicholls, J.G. und Orkand, R.K.:

Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia.

J. Neurophysiol. 29:768, 1966

Lewis, S.A., Eaton, D.C. und Diamond, J.M.:

The mechanism of Na⁺ transport by rabbit urinary bladder.

J. Membr. Biol. 28:41, 1976

Li, J.H.-Y. und De Sousa, R.C.:

Inhibitory and stimulatory effects of amiloride analogues on sodium transport in frog skin.

J. Membrane Biol. 46:155, 1979

Li, J.H.-Y. und Lindemann, B.:

Chemical stimulation of Na transport through amiloride-blockable channels of frog skin epithelium.

J. Membr. Biol. 75:179, 1983a

Li, J.H.-Y. und Lindemann, B.:

Competitive blocking of epithelial sodium channels by organic cations: The relationship between macroscopic and microscopic inhibition constants.

J. Membrane Biol. 76:235, 1983b

Lindemann, B.:

Sodium-specific membrane channels of frog skin are pores: current fluctuations reveal high turnover.

Science 195, 1976

Lindemann, B.:

Circuit analysis of epithelial ion transport I: Derivation of network equation.

Bioelectrochem. Bioenerg. 4:275, 1977a

Lindemann, B.:

Circuit analysis of epithelial ion transport II: Concentration- and voltage-dependent conductances and sample calculations.

Bioelectrochem. Bioenerg. 4:287, 1977b

Lindemann, B. und van Driessche, W.:

Sodium-specific membrane channels of frog skin are pores: current fluctuations reveal high turnover.

Science 195:292, 1977

Lindemann, B. und Gehardt, U.:

Delayed changes of Na-permeability in response to steps of $(Na)_o$ at the outer surface of frog skin and frog bladder.

In: Transport Mechanisms in Epithelia, edited by H.H. Ussing, and N.A. Thorn, Copenhagen, Munksgaard, Alfred Benzon Symposium V:115, 1973

Lindemann, B., Gebhardt, U. und Fuchs, W.:

A flow chamber for concentration-step experiments with epithelial membranes.

T.-L.-T. J. Life Sci. Oxford 2:15, 1972

Lindemann, B. und Voûte, C.:

Structure and function of the epidermis.

In: Frog Neurobiology, pp:169, edited by R.Liinas und W. Precht, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976

Linderholm, H.:

Active transport of ions through frog skin with special reference to the action of certain diuretics.

Acta Physiol. Scand. 27 (Suppl. 97):10, 1952

Lindley, B.D. und Hoshiko, T.:

The effect of alkali metal cations and common anions on the frog skin potential.

J. Gen. Physiol. 47:749, 1964

Ling, G.N. und Gerard, R.W.:

The normal membrane potential at frog sartorius fibers.

J. Cell. Comp. Physiol. 34:383, 1949

Liu, L.F. und Wang, J.C.:

Micrococcus luteus DNA gyrase: Active components and a model for its supercoiling of DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:2098, 1978

Loewenstein, W.R.:

Permeability of membrane junctions.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 137:441, 1966

Loewenstein, W.R.:

Intracellular communication.

Sci. Am. 222:78, 1970

Loewenstein, W.R., Kanno, Y. und Socolar, S.J.:

The cell-to-cell channel.

Fed. Proc. 37:2645, 1978

Macknight, A.D.C., Civan, M.M. und Leaf, A.:

Some effects of ouabain on cellular ions and water in epithelial cells of toad urinary bladder.

J. Membr. Biol. 20:387, 1975

Macknight, A.D.C., DiBona, D.R. und Leaf, A.:

Sodium transport across toad urinary bladder: A model "tight" epithelium.

Am. Physiol. Soc. 60:615, 1980

Mandel, L.J.:

Actions of external hypertonic urea, ADH and theophylline on transcellular and extracellular solute permeabilities in frog skin.

J. Gen. Physiol. 65:599, 1975

Mandel, J.:

Effects of pH, Ca, ADH, and theophylline on kinetics of Na entry in frog skin.

Am. J. Physiol. 235:C35, 1978

Mandel, L.J. und Curran, P.F.:

Chloride flux via a shunt pathway in frog skin: apparent exchange diffusion.

Biochim. Biophys. Acta 282:258, 1972a

Mandel, L.J. und Curran, P.F.:

Response of the frog skin to steady-state voltage clamping. I. The shunt pathway.

J. Gen. Physiol. 59:503, 1972b

Marians, K.H., Ikeda, J., Schlagman, S. und Hurwitz, J.:

Role of DNA gyrase in Φ X replicative-form replication in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:1965, 1977

Marmor, M.F. und Gorman, A.L.F.:

Membrane potential as the sum of ionic and metabolic components.

Science 167:65, 1970

Martin, D.W. und Curran, P.F.:

Reversed potentials in isolated frog skin. II. Active transport of chloride.

J. Cell. Physiol. 67:367, 1966

Martínez-Palomo, A., Erlij, D. und Bracho, H.:

Localisation of permeability barriers in the frog skin epithelium.

J. Cell. Biol. 50:277, 1971

Mills, J.W., Ernst, S.A.:

Location of sodium pump sites in frog urinary bladder.

Biochim. Biophys. Acta 375:268, 1975

Mills, J.W., Ernst, S.A. und DiBona, D.R.:

Localization of Na^+ -pump sites in frog skin.

J. Cell. Biol. 73:88, 1977

Morel, F. und Leblanc, G.:

Kinetics of sodium and lithium accumulation in isolated frog skin epithelium.

In: Transport Mechanisms in Epithelia, edited by H.H. Ussing, and N.A.

Thorn, Copenhagen, Munksgaard, Alfred Benzon Symposium V:73, 1973

Moreno, J.H., Reisin, I.L., Rodríguez Boulan, E., Rotunno, C.A. und Cerejido, M.:

Barriers to sodium movement across frog skin.

J. Membrane Biol. 11:99, 1973

Moreno, J.H.:

Blockade of gallbladder tight junction cation-selective channels by 2,4,6-tri-aminopyrimidinium (TAP).

J. Gen. Physiol. 66:97, 1982

Mullins, L.J. und Brinley, F.J.Jr.:

Potassium fluxes in dialyzed squid axons.

J. Gen. Physiol. 53:704, 1969

Nagel, W.:

The intracellular electrical potential profile difference of frog skin epithelium.

Pflügers Arch. 365:135, 1976a

Nagel, W.:

Intercellular junctions of frog skin epithelial cells.

Nature 264:469, 1976b

Nagel, W.:

The dependence of the electrical potentials across the membranes of the frog skin upon the concentration of sodium in the mucosal solution.

J. Physiol. 269:777, 1977

Nagel, W.:

Evidence for electrogenic Na transport from the cytoplasmatic tissue pool of frog skin epithelium.

J. Physiol. 284:146, 1978a

Nagel, W.:

Effect of antidiuretic hormone upon electrical potential and resistance of apical and basolateral membranes of frog skin.

J. Membrane Biol. 42:99, 1978b

Nagel, W.:

Rheogenic sodium transport in a tight epithelium, the amphibian skin.

J. Physiol. 302:281, 1980

Nagel, W. und Crabbé, J.:

Mechanism of action of aldosterone on active sodium transport across toad skin.

Pflügers Arch. 385:181, 1980

Nagel, W. und Dörge, A.:

Effect of amiloride on sodium transport of frog skin.

Pflügers Arch. 317:84, 1970

Nagel, W. und Dörge, A.:

A study of the different sodium compartments and the transepithelial sodium flux of the frog skin with the use of ouabain.

Pflügers Arch. 324:267, 1971

Nagel, W. und Essig, A.:

Relationship of transepithelial electrical potential to membrane potentials and conductance ratios in frog skin.

J. Membr. Biol. 69:125, 1982

Nagel, W., Garcia-Diaz, J.F. und Armstrong, W.McD.:

Intracellular ionic activities in frog skin.

J. Membrane Biol. 61:127, 1981

Nagel, W., Garcia-Diaz, J.F. und Essig, A.:

Cellular and paracellular conductance patterns in voltage-clamped frog skin.

Membrane Biophys. 11:221, 1983a

Nagel, W., Garcia-Diaz, J.F. und Essig, A.:

Contribution of junctional conductance to the cellular voltage-divider ratio in frog skin.

Pflügers Arch. 399:336, 1983b

Nagel, W. und Hirschmann, W.:

K^+ -Permeability of the outer border of the frog skin (*R. temporaria*).

J. Membrane Biol. 52:107, 1980

Nastuk, W.L. und Hodgkin, A.L.:

The electrical activity of single muscle fibers.

J. Cell. Comp. Physiol. 35:39, 1950

Nellans, H.N. und Schultz, S.G.:

Relations among transepithelial sodium transport, potassium exchange and cell volume in rabbit ileum.

J. Gen. Physiol. 68:441, 1976

Nielsen, R.:

A 3 to 2 coupling of the Na-K-pump responsible for the transepithelial Na transport in frog skin disclosed by the effect of Ba.

Acta Physiol. Scand. 107:189, 1979

Nishio, A. und Uyeki, E.M.:

Inhibition of DNA synthesis in permeabilized L cells by novobiocin.

Acad. Press 106:1448, 1982

Orlind, B.:

Relationship between renal tubular secretion and effects of five loop diuretics.

J. Pharmacol. Exp. Therap. 211:238, 1979

Odlind, B.:

Renal tubular secretion and effects of the alkaline diuretics amiloride, tizolamide (Hoe 740) and 2-aminomethyl-4-(1,1-di-methylethyl)-6-iodo-phenol hydrochloride (MV-447).

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 317:357, 1981

Odlind, B. und Loennerholm, G.:

Renal tubular secretion and effects of chlorothiazide, hydrochlorothiazide and clopamide: a study in the avian kidney.

Acta Pharmacol. Toxicol. 51:187, 1982

Okada, Y., Tsuchiya, W., Irimajiri, A. und Inouye, A.:

Electrical properties and active solute transport in rat small intestine.

1. Potential profile changes associated with sugar and amino acid transports.

J. Membr. Biol. 31:205, 1977

Post, R.L. und Jolly, P.C.:

The linkage of sodium, potassium and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane.

Biochim. Biophys. Acta 25:118, 1957

Rawlins, F., Mateu, L., Fragachan, F. und Whitembury, G.:

Isolated toad skin epithelium: transport characteristics.

Pflügers Arch. Ges. Physiol. 316:64, 1970

Rick, R.:

Analyse des transepithelialen Natriumtransportes mit Hilfe der Elektronenstrahlmikrosonde.

Habilitationsschrift, Ludwig Maximilians-Universität München, 1980

Rick, R., Dörge, A. und Nagel, W.:

Influx and efflux of sodium at the outer surface of frog skin.

J. Membrane Biol. 22:183, 1975

Rick, R., Dörge, A., v.Arnim, E. und Thureau, K.:

Electron microprobe analysis of frog skin epithelium: Evidence for a syncytial sodium transport compartment.

J. Membr. Biol. 39:313, 1978

Rick, R., Dörge, A. und Thureau, K.:

Electron microprobe analysis of frog skin epithelium: pathway of transepithelial sodium transport.

J. Gen. Physiol. 36:197, 1981a

Rick, R., Dörge, A. und Weigel, M.:

Action of novobiocin on Na transport in frog skin epithelium.

Pflügers Arch. Suppl. 389:R46, 1981b

Rick, R., Roloff, Ch., Dörge, A., Beck, F.X. und Thureau, K.:

Intracellular electrolyte concentrations in the frog skin epithelium: effect of vasopressin and dependence on the Na concentration in the bathing media.

J. Membrane Biol. 78:129, 1984

Riddle, T.G., Mandel, L.J. und Goldner, M.M.:

Dilantin-calcium interaction and active Na transport in frog skin.

Europ. J. Pharmacol. 33:189, 1975

Rose, B.:

Intracellular communication and some structural aspects of membrane junctions in a simple cell system.

J. Membrane Biol. 5:1, 1971

Rose, R.C. und Schultz, S.G.:

Studies on the electrical potential profile across rabbit ileum.

J. Gen. Physiol. 57:639, 1971

Rose, R.C., Gelarden, R.T. und Nahrwold, D.L.:

The electrical potential of isolated human gallbladder.

Am. J. Physiol. 224:1320, 1973

Rose, R.C., Nahrwold, D.L. und Koch, M.J.:

Electrical potential profile in rabbit ileum: role of rheogenic Na transport.

Am. J. Physiol. 232:E5, 1977

Rotunno, C.A., Vilallonga, F.A., Fernández, M. und Cereijido, M.:

The penetration of sodium into the epithelium of the frog skin.

J. Gen. Physiol. 55:716, 1970

Schoffeniels, E.:

An isolated single electroplax preparation. II. Improved preparation for studying ion flux.

Biochim. Biophys. Acta 26:585, 1957

Schultz, S.G.:

Electrical potential differences and electromotive forces in epithelial tissues.

J. Gen. Physiol. 59:794, 1972

Schultz, S.G., Frizzell, R.A. und Nellans, H.N.:

Active sodium transport on the electrophysiology of rabbit colon.

J. Membr. Biol. 33:351, 1977a

Schultz, S.G., Frizzell, R.A. und Nellans, H.N.:

An equivalent electrical circuit model for 'sodium-transporting' epithelia in the steady-state.

J. Theor. Biol. 65:215, 1977b

Simpson, I., Rose, B. und Loewenstein, W.R.:

Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels.

Science 195, 1976

Skou, J.C.:

Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane.

Physiol. Rev. 45:596, 1965

Skou, J.C. und Zerahn, K.:

Investigations on the effect of some local anaesthetics and other amines on the active transport of sodium through the isolated short-circuited frog skin.

Biochim. Biophys. Acta 35:324, 1959

Slayman, C.L. und Slayman, C.W.:

Measurement of membrane potentials in *Neurospora*.

Science 136:875, 1962

Smith, P.G.:

The low-frequency electrical impedance of the isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. 81:355, 1971

Staehelin, L.A.:

Structure and function of intercellular junctions.

Int. Rev. Cytol. 39:191, 1974

Stein, W.D.:

The movement of molecules across cell membranes.

Academic Press, Inc. N.Y., 1967

Sugino, A., Peebles, C.L., Kreuzer, K.N. und Cozzarelli, N.R.:

Mechanism of action of nalidixic acid: purification of Escherichia colinal A gene product and its relationship of DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:4767, 1977

Sugino, A., Higgins, N.P., Brow, P.O., Peebles, C.L. und Cozzarelli, N.R.:

Energie coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:4838, 1978

Taylor, A. und Windhager, E.E.:

Possible role of cytosolic calcium and Na-Ca-exchange in regulation of transepithelial sodium transport.

Am. J. Physiol. 236:505, 1979

Teorell, T.:

Membrane electrophoresis in relation to bio-electrical polarization effects.

Arch. Sci. Physiol. 3:205, 1949

Thomas, R.C.:

Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells.

Physiol. Rev. 52:563, 1972a

Thomas, R.C.:

Intracellular sodium activity on the sodium pump in snail neurons.

J. Physiol. 220:55, 1972b

Thompson, S.M. und Dawson, D.C.:

Sodium uptake across the apical border of the isolated turtle colon: confirmation of the two-barrier model.

J. Membr. Biol. 42:357, 1978

Urakabe, S., Handler, J.S. und Orloff, J.:

Effect of hypertonicity on permeability properties of toad bladder.

Am. J. Physiol. 210:1179, 1970

Ussing, H.H.:

The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.

Acta Physiol. Scand. 17:1, 1949

Ussing, H.H.:

The distinction by means of tracers between active transport and diffusion.

Acta Physiol. Scand. 19:43, 1950

Ussing, H.H.:

The relation between active transport and bioelectric phenomena.

Lectures at the Instituto de Biofísica, Universidade do Brasil, 1955

Ussing, H.H., Elij, D. und Lassen, U.:

Transport pathways in biological membranes.

Am. Rev. Physiol. 36:17, 1974

Ussing, H.H. und Windhager, E.:

Nature of shunt path and active sodium transport path through frog skin epithelium.

Acta Physiol. Scand. 61:484, 1964

Ussing, H.H. und Zerahn, K.:

Active transport of sodium as the source of the electric current in the short-circuited isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. 23:110, 1951

Voûte, C.L. und Ussing, H.H.:

Some morphological aspects of active sodium transport.

J. Cell. Biol. 36:625, 1968

Whittembury, G.:

Electrical potential profile of the toad skin epithelium.

J. Gen. Physiol. 47:795, 1964

Whittembury, G.F., Rawlins, F.A. und Boulpaep, E.L.:

Paracellular pathway in kidney tubules: electrophysiological and morphological evidence.

In: Transport Mechanisms in Epithelia, edited by H.H. Ussing and N.A. Thorn, Copenhagen: Munksgaard, Alfred Benzon Symp. V: 577, 1973

Yonath, J und Civan, M.M.:

Determination of the driving force of the Na^+ pump in toad bladder by means of vasopressin.

J. Membr. Biol. 5:366, 1971

Zadunaisky, J.A., Candia, O.A. und Chiarandini, D.J.:

The origin of the short-circuit current in the isolated skin of the South American frog *Leptodactylus ocellatus*.

J. Gen. Physiol. 47:393, 1963

Zeiske, W. und Lindemann, B.:

Chemical stimulation of Na^+ current through the outer surface of frog skin epithelium.

Biochim. Biophys. Acta 352:323, 1974

Zeiske, W. und van Driessche, W.:

A salurable K^+ -pathway across the outer border of frog skin (*Rana temporaria*): kinetics and inhibition by Cs^+ and other cations.

J. Membrane Biol. 47:77, 1979

VERWENDETE SYMBOLE

<u>Symbol</u>	<u>Einheit</u>	<u>Definition</u>	<u>Wert</u>
A	cm ²	Fläche, speziell Oberfläche des Haut- stücks	3.2
c _i		Teilchenkonzentration innen	
c _o		Teilchenkonzentration außen (o steht für engl. "outer")	
$\Delta c = c_i - c_o$		Konzentrationsgradient	
(Cl ⁻) _o	mM	Cl ⁻ -Konzentration im Außenbad	
d	cm	Membrandicke	
D	cm ² /sec	=uRT(F) ⁻¹ , Diffusionskonstante für ein Teilchen	
dg _{Na}	mS/cm ²	"slope"-Leitfähigkeit der apikalen Membran	
E _{Cl}	mV	Gleichgewichtspotential für Cl ⁻	
E _i	mV	elektromotorische Kraft der Innen- bran	
E _{Ion}	mV	Gleichgewichtspotential für ein gegebenes Ion	
E _K	mV	Gleichgewichtspotential für K ⁺	
E' _{Na}	mV	Gleichgewichtspotential für Na ⁺	
E _{Na}	mV	treibende Kraft des transepithelialen Na ⁺ -Transports	
E _o	mV	Elektromotorische Kraft der Außen- membran	
F	A·sec·mol ⁻¹	Faraday Konstante	96 500
f(R _o)		=R _o (R _o +R _i) ⁻¹ , fraktioneller Wider- stand	
g _i	mS/cm ²	Innenmembranleitfähigkeit	
g _{Na}	mS/cm ²	Natriumleitfähigkeit der apikalen Membran	
g _o	mS/cm ²	Außenmembranleitfähigkeit	
g _{sh}	mS/cm ²	"shunt"-Leitfähigkeit, bestimmt unter 0.1 mM Amilorid	

<u>Symbol</u>	<u>Einheit</u>	<u>Definition</u>	<u>Wert</u>
g_t	mS/cm^2	transepitheliale Leitfähigkeit	
g_{tc}	mS/cm^2	transzelluläre Leitfähigkeit, bestimmt durch Subtraktion von g_{sh} von g_t	
I	A/cm^2	$=I'/A$, Strom geladener Teilchen pro Fläche	
I'	A	Teilchenstrom	
I_{Na}	$\mu\text{A/cm}^2$	Natriumionenstrom (transepithelial)	
I_{sc}	$\mu\text{A/cm}^2$	Kurzschlußstrom (sc für engl. "short-circuit")	
I_{Max}	$\mu\text{A/cm}^2$	maximaler Kurzschlußstrom	
K_a	mM	Konzentration für Amilorid, die eine halbmaximale Hemmung des I_{sc} hervorruft	
$(K^+)_i$	mM	Kaliumkonzentration innen, speziell intrazellulär	
K_M	nm/sec	Permeabilität von Na^+ bei halbmaximalem Strom $I_{sc} = 1/2 I_{Max}$	
K_n	mM	Konzentration von Novobiocin, die eine halbmaximale Stimulation des I_{sc} bewirkt ($(\text{Na})_o = 110 \text{ mM}$)	
K_{Na}	mM	Konzentration von $(\text{Na}^+)_o$, für die I_{sc} halbmaximal	
$(K^+)_o$	mM	Kaliumkonzentration außen, speziell extrazellulär	
μ		chemisches Potential	
μ'		elektrochemisches Potential	
N		Anzahl von Teilchen	
dN/dt		Teilchen pro Zeiteinheit	
$(\text{Na}^+)_i$	mM	Natriumkonzentration innen, speziell intrazellulär	
$(\text{Na}^+)_o$	mM	Natriumkonzentration außen, speziell extrazellulär	
P	cm/sec	$= D/d$, Permeabilitätskonstante	
P_{Cl}	nm/sec	Chlorpermeabilität der apikalen Membran	

<u>Symbol</u>	<u>Einheit</u>	<u>Definition</u>	<u>Wert</u>
P_K	nm/sec	Kaliumpermeabilität der apikalen Membran	
P_{Na}	nm/sec	Natriumpermeabilität der apikalen Membran	
pH_o		pH der äußeren Badelösung	
r		Pumpverhältnis Natrium zu Kalium	
R	Joule·mol ⁻¹ ·K ⁻¹	Gaskonstante	8.31
R_i	cm ²	Widerstand der Innenmembran	
R_o	cm ²	Widerstand der Außenmembran	
R_{sh}	cm ²	"shunt"-Widerstand	
R_t	cm ²	transepithelialer Gesamtwiderstand	
T	K	absolute Temperatur	273.16+t °C
$t_{1/2}$	min	Zeit für Erreichen des halbmaximalen Effekts	
u	cm ² (V·sec) ⁻¹	Beweglichkeit eines geladenen Teilchens	
U_o	mV	Potentialdifferenz über die apikale Membran (außen-innen)	
V	mV	elektrisches Potential	
V_t	mV	transepitheliales elektrisches Potential	
z		Valenzzahl von Ionen	

Herrn Prof. Dr. med. K. Thureau möchte ich an dieser Stelle für das interessante Thema dieser Arbeit, die Arbeitsmöglichkeit an seinem Lehrstuhl und das Interesse, das er meiner Arbeit entgegen brachte, danken.

Mein Dank gilt besonders Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Roger Rick für seine intensive Betreuung, die zu jeder Zeit in Gesprächen und Ratschlägen entscheidend dazu beitrug, sachliche und experimentelle Schwierigkeiten zu überwinden.

Danken will ich auch allen, die zur Entstehung dieser Arbeit mit beigetragen haben besonders:

Herrn Prof. Dr. med. A. Dörge und Herrn Prof. Dr. med. W. Nagel für hilfreiche Gespräche und wertvolle Anregungen,

Herrn Dipl.-Ing. E. Strigl für elektronische Einrichtungen und technische Hilfen.

Herzlich danken möchte ich Frau U. Vogl für die Übernahme der schwierigen Schreibarbeit, Frau B. Mayer für ihre unermüdliche Mithilfe und allen anderen Mitarbeitern für die gute und hilfsbereite Zusammenarbeit, ohne die ein Gelingen der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

LEBENS LAUF

22.07.1954	geboren in München als fünftes Kind des Rektors an Grundschulen Konrad Sesselmann und seiner Frau Annemarie, geb. Auer
1961 - 1965	Besuch der Grundschule in München
1965 - 1974	Besuch des Elsa Brandström-Gymnasiums in München (Neusprachlicher Zweig)
1974	Abitur
1974 - 1982	Physikstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1977	Vordiplom
1980	Beginn der Diplomarbeit am Physiologischen Institut der Universität München (Lehrstuhl Prof. Dr. Thureau): "Eigenschaften ionensensitiver Mikroelektroden bei intrazellulären Messungen"
31.03.1982	Diplom
01.04.1982 bis 31.08.1984	Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft am Physiologischen Institut der Universität München (Promotionsarbeit)
01.09.1984	Anstellung als Physikerin am Klinikum rechts der Isar (Röntgendiagnostik: Prof. Dr. Anacker)

